

Von Horst Kunz\*

Professor Leopold Horner zum 75. Geburtstag gewidmet

Glycopeptide sind Partialstrukturen aus den Verknüpfungsregionen von Glycoproteinen und enthalten daher wie diese stets glycosidische Bindungen zwischen Kohlenhydrat- und Peptidteil. Glycoproteine sind nicht nur weit verbreitet, sondern auch entscheidende Faktoren der posttranslationalen biologischen Selektivität, insbesondere bei der biologischen Erkennung. Die gezielte Synthese von Glycopeptiden erfordert stereoselektive Reaktionen zur Herstellung der glycosidischen Verknüpfung zwischen Kohlenhydrat- und Peptidteil und Schutzgruppentechniken, die die selektive Deblockierung nur einer funktionellen Gruppe an diesen polyfunktionellen Molekülen ermöglichen. Diesen hohen Anforderungen genügt man, wenn man die schon früher verwendeten, hydrogenolytisch spaltbaren Benzyl-Schutzgruppen mit den basenlabilen 2-Phosphonioethoxycarbonyl(Peoc)- oder (9-Fluorenyl)methoxycarbonyl(Fmoc)-Schutzgruppen oder mit der unter neutralen Bedingungen reduktiv abspaltbaren Bromethylgruppe kombiniert. Auch die acidolytische Abspaltung der *tert*-Butyloxycarbonyl(Boc)- und der *tert*-Butylgruppe sind erfolgreich angewendet worden, obwohl unter sauren Bedingungen Anomerisierung oder Spaltung der glycosidischen Bindungen eintreten können, zumal wenn Nucleophile zugegen sind. Die stabilen, zweistufigen 2-Pyridylethoxycarbonyl(Pyoc)-Schutzgruppen ermöglichen eine sichere Synthese komplexer Glycopeptide dadurch, daß sie erst nach Modifizierung, dann aber unter milden Bedingungen, abgespalten werden können. Besonders geeignet für die Synthese empfindlicher Glycopeptide sind die stabilen Allyl-Schutzgruppen. Sie können edelmetallkatalysiert unter praktisch neutralen Bedingungen hochselektiv und effektiv von den komplexen Glycopeptiden abgespalten werden. Nach diesen Verfahren wurden Glycopeptide aufgebaut, die Partialstrukturen von biologisch interessanten Glycoproteinen entsprechen. Von Schutzgruppen befreite Glycopeptide, die als tumorassoziierte Antigenstrukturen Bedeutung haben, konnten an Rinderserumalbumin als biologischem Trägermolekül angekoppelt werden, ohne daß ein künstliches Verbindungsglied (Spacer) eingesetzt werden mußte.

## 1. Glycoproteine als Träger der biologischen Selektivität an Membranen

Die komplexen molekularen Vorgänge in einem biologischen System können nur dann geregelt ablaufen, wenn sie selektiv gesteuert werden. Der bekannteste und wohl am besten untersuchte biologische Steuerungsvorgang ist die Reduplikation und Transkription des genetischen Codes der Desoxyribonucleinsäuren und die Translation der genetischen Information in der Proteinbiosynthese<sup>[1]</sup>. Durch diese Steuerung wird sichergestellt, daß die Proteine – z. B. als entscheidende biologische Katalysatoren, Enzyme – zuverlässig immer wieder so aufgebaut werden, daß sie ihre häufig sehr selektive Aufgabe im Zellgeschehen erledigen können. In der Regel übt aber ein Protein seine spezifische Funktion nur an bestimmten Orten der Zelle aus. Biologische Selektierungsvorgänge, die vorwiegend an den intrazellulären und äußeren Zellmembranen ablaufen, müssen deshalb ein am endoplasmatischen Reticulum neu synthetisiertes Protein zu seinem „Einsatzort“ führen. Diese post-

translationale biologische Selektivität basiert offenbar auf einer Rezeptor-Effektor-Wechselwirkung, bei der – zumindest in den eukaryontischen Zellen – die Glycoproteine eine entscheidende Rolle spielen<sup>[2]</sup>.

Daß dabei dem Kohlenhydratteil der Glycoproteine eine Schlüsselfunktion zufallen kann, haben zuerst Ashwell et al.<sup>[3]</sup> gezeigt. Sie fanden, daß das Kupfertransport-Glycoprotein Coeruloplasmin im Kaninchenserum eine biologische Halbwertszeit von 54 h hat. Nachdem sie aber von den Oligosaccharid-Seitenketten des Coeruloplasmins mit Neuraminidase die endständigen *N*-Acetyl-neuraminsäure(Sialinsäure)-Reste entfernt und damit Galactose freigelegt hatten, fanden sie für dieses Asialogcoeruloplasmin nur noch eine Halbwertszeit von weniger als 5 min im Kaninchenserum. Als Ursache dieses drastischen biologischen Effekts konnten sie die Erkennung der nunmehr endständigen Galactose durch einen spezifischen Rezeptor in der Membran der Leberzellen des Kaninchens nachweisen; ein Selektionsmechanismus, der für viele analog gebaute Glycoproteine und für Säugetiere allgemein gilt<sup>[3]</sup>. Dieser Galactose-spezifische Rezeptor in der Hepatocytenmembran, der wie ein Lectin wirkt, ist ebenfalls ein Glycoprotein<sup>[4]</sup>.

Auch für den gezielten Transport lysosomaler Enzyme in die Lysosomen der Fibroblasten dienen die Kohlenhydratseitenketten von Glycoproteinen als Erkennungssi-

[\*] Prof. Dr. H. Kunz

Institut für Organische Chemie der Universität  
J.-I.-Becher-Weg 18-20, D-6500 Mainz

[\*\*] Erweiterte Fassung des Vortrages, der auf einer Max-Bergmann-Konferenz am 24. Oktober 1985 in Bozen gehalten wurde.

gnal: Rezeptoren, die wiederum Glycoproteine sind, reagieren auf endständige Mannose-6-phosphat-Reste<sup>[15]</sup>. Werden die Fibroblasten mit dem Antibioticum Tunicamycin behandelt, das die bei der Biosynthese der *N*-Glycoproteine erforderliche Bindung von Kohlenhydratseitenketten an die Amidgruppe von Asparagin unterbindet, gelangen die dann gebildeten, kohlenhydratfreien lysosomalen Enzyme nicht mehr an ihren Wirkungsort, in die Lysosomen.

Die Bedeutung der Glycoproteine für die Steuerung des biologischen Geschehens wird auch darin deutlich, daß so entscheidende Prozesse wie das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung durch die Blockierung des Kohlenhydrateinbaus in die Proteine nachhaltig beeinflußt werden<sup>[6]</sup>. In Einklang damit fand man, daß sich normal wachsende Zellen und Tumorzellen stark im Glycoproteinprofil ihrer Zellmembranen unterscheiden<sup>[7]</sup>. Die veränderten Glycoproteinstrukturen in den Tumorzellmembranen scheinen zum Teil tumorassoziierte Antigene zu sein<sup>[8]</sup>. Die Rolle der Oligosaccharidstrukturen von Glykokonjugaten als antigene Determinanten in verschiedenen Blutgruppensystemen ist besonders bekannt<sup>[9]</sup>. Neuere Untersuchungen zeigten, daß Wechselwirkungen vom Kohlenhydrat-Lectin-Typ auch bei Infektionsvorgängen vorliegen: Manche Bakterien und Viren haben Oberflächenlectine, die spezifisch an Kohlenhydrate auf der Oberfläche der Wirtszellen binden und so die Infektion einleiten<sup>[10]</sup>.

Diese Ergebnisse der biochemischen, molekularbiologischen und immunologischen Forschung eröffnen ganz neue Möglichkeiten für die Diagnose und die gezielte Therapie pathogener Prozesse, z. B. für die Entwicklung selektiver Chemotherapeutika sowie für die Adressierung von Wirkstoffen an bestimmte Gewebe durch Ausnutzung selektiver Signal-Rezeptor-Wechselwirkungen<sup>[11]</sup> und durch die Gewinnung von Antikörpern gegen tumorassoziierte Glykokonjugatstrukturen<sup>[7, 12]</sup>. Berücksichtigt man darüber hinaus, daß die Oligosaccharidanteile die Glycoproteine oft vor dem Angriff proteolytischer Enzyme schützen<sup>[13]</sup>, ist die Entwicklung oral applizierbarer Peptidwirkstoffe vorstellbar, indem in die Wirkstoffe geeignete Glycosidanteile eingebaut werden.

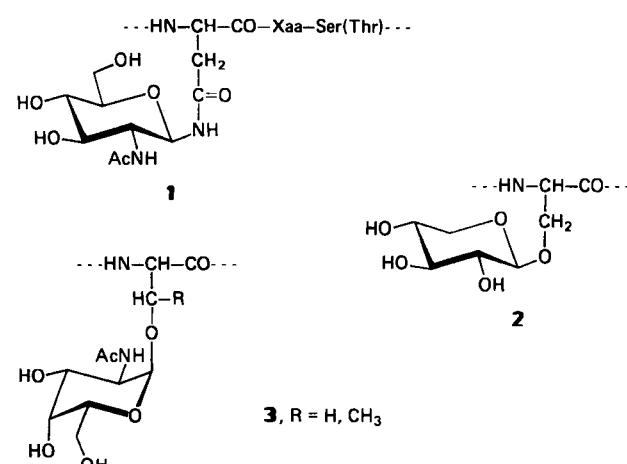
Vor diesem Hintergrund wird neben der schon hoch entwickelten Peptidsynthese<sup>[14]</sup> die Glycopeptidsynthese zunehmend interessanter.

## 2. Die Kohlenhydrat-Peptid-Verknüpfungsregionen der Glycoproteine

Trotz der großen Vielfalt natürlicher Glycoproteine variiert die Art der kovalenten Bindung zwischen den Protein- und Kohlenhydratteilen nur relativ wenig<sup>[2]</sup>. Am häufigsten findet man die *N*-Glycoproteine 1, bei denen in der Regel die Seitenketten-Amidgruppe eines Asparagin-Bausteins und ein *N*-Acetyl-glucosamin-Rest β-*N*-glykosidisch verknüpft sind<sup>[15]</sup>. Zum Strukturtyp 1, dessen Biosynthese am besten bekannt ist<sup>[16]</sup>, gehören Serumkomponenten wie die Amylasen als Enzyme, Plasmaproteine, z. B. Fibrinogen und Transferrin, die Immunoglobuline, Hormone wie Choriongonadotropin und Hormonvorläufer wie Thyreoglobulin sowie Membranglycoproteine, z. B. Glycosyltransferasen, Bande-III-Glycoprotein, Rhodopsin und Rezeptorglycoproteine wie der Galactose-spezifische

Rezeptor der Hepatocytenmembran. Die *N*-Glycoproteine 1 zeichnen sich weiterhin durch eine charakteristische Sequenz in der Verknüpfungsregion aus: Dem *N*-glycosylierten Asparagin folgt C-terminal als übernächste Aminosäure immer Serin oder Threonin. Die Hydroxygruppe dieser Bausteine scheint katalytisch am Glycosyltransfer beteiligt zu sein<sup>[17]</sup>.

Bis in die jüngste Vergangenheit ging man davon aus, daß in der Natur ausschließlich die *N*-glykosidische Bindung des Typs 1 vorkommt<sup>[2]</sup>. Neuere Untersuchungen haben aber ergeben, daß Zelloberflächenglycoproteine von Halobakterien *N*-Glucosyl-<sup>[18]</sup> und *N*-Galactosaminylasparagin-Strukturen<sup>[19]</sup> enthalten. Aus der glomerulären Basalmembran von Ratten wurde ein nephritogenes Glycopeptid mit offenbar einer α-*N*-glykosidischen Bindung zwischen Glucose und dem Peptidteil isoliert<sup>[20]</sup>; als Bindungspartner wird Glutamin vermutet<sup>[21]</sup>.



Die zweite wichtige Verknüpfungsart zwischen Kohlenhydrat- und Peptidteilen in Glycoproteinen ist die *O*-glykosidische Bindung. Die β-*O*-glykosidische Bindung zwischen Xylose und Serin in 2 ist charakteristisch für die Proteoglycane der extrazellulären Matrix und des Bindegewebes<sup>[22]</sup>. Die α-*O*-glykosidische Verknüpfung zwischen *N*-Acetylgalactosamin und Serin oder Threonin in 3 wurde zuerst in den Mucinen (Glycoproteinen der Schleime) gefunden<sup>[2]</sup>. Sie ist charakteristisch für viele andere Serum- und Membranglycoproteine, zu denen u. a. die Blutgruppen-Glycoproteine<sup>[23]</sup>, das menschliche Glycophorin<sup>[24]</sup>, Epiglycanin<sup>[25]</sup> und die Glycoproteine des tumorassoziierten T<sub>N</sub>- und T-Antigentyps<sup>[8]</sup> gehören.

Praktisch ausschließlich im Collagen und in collagenartigen Makromolekülen tritt die β-glykosidische Verknüpfung von Galactose und δ-Hydroxylysin auf<sup>[26]</sup>. Interessant ist, daß dieses Strukturelement auch in der C1q-Komponente des Komplementsystems vorkommen soll<sup>[27]</sup>. Für weitere Varianten der glykosidischen Verknüpfung in *O*-Glycoproteinen muß auf ausführliche Zusammenfassungen verwiesen werden<sup>[2]</sup>.

## 3. Die Glycopeptidsynthese im Vergleich zur Peptidsynthese

Schon die Partialstrukturen der Verknüpfungsregionen von Glycoproteinen 1–3 machen deutlich, daß bei der

chemischen Synthese dieser polyfunktionellen Moleküle die Probleme der Peptid- und die der Kohlenhydratchemie zusammenkommen. Beide Zweige der präparativen Naturstoffchemie wurden von *Emil Fischer* entscheidend begründet<sup>[28]</sup>. Die analytischen Möglichkeiten der damaligen Zeit erlaubten es aber nicht, die große Verbreitung und Bedeutung der Konjugate aus Proteinen und Kohlenhydraten zu erkennen. So gingen denn von *Emil Fischer* zwei Schulen aus, für die in der Peptidchemie Namen wie *Max Bergmann*, *Hans Leuchs* und *Emil Abderhalden* und in der Kohlenhydratchemie Namen wie *Otto Warburg*, *Carl Freudenberg* und *Burkhard Helferich* stehen. Über Jahrzehnte wurden dann Proteine und Kohlenhydrate weitgehend getrennt behandelt<sup>[29]</sup>.

Im Vergleich zur Peptidsynthese sind bei der Glycopeptidsynthese mehrere zusätzliche funktionelle Gruppen reversibel und möglichst selektiv zu schützen. Noch wichtiger aber sind die glycosidischen Bindungen in 1–3: Sie müssen sowohl stereoselektiv hergestellt<sup>[30,31]</sup> als auch während der gesamten Synthese zuverlässig erhalten bleiben<sup>[32]</sup>.

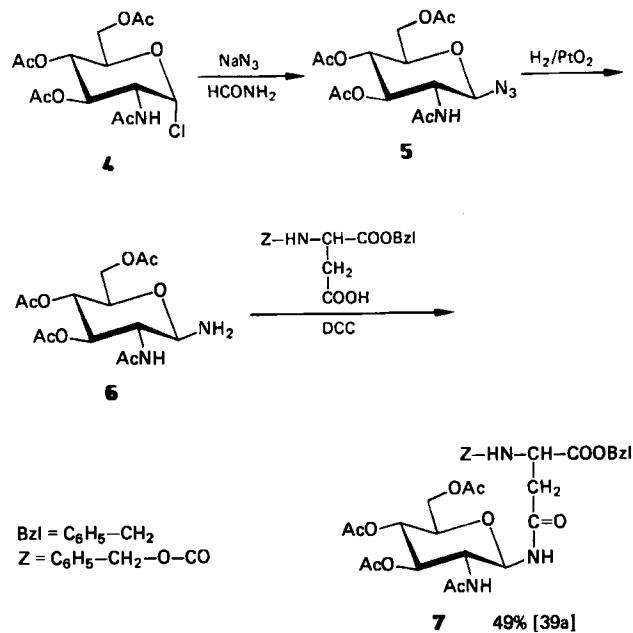
Ein separates Thema sind die Oligosaccharide der Glycoproteine, deren Struktur und Biosynthese in zahlreichen Übersichten behandelt worden ist<sup>[2,6,16,29,33–35]</sup>. Über die chemische Synthese solcher Oligosaccharide wurde in neueren, sich ergänzenden Übersichten<sup>[36,37]</sup> berichtet, so daß in diesem Fortschrittsbericht nicht darauf eingegangen werden muß.

#### 4. Die Knüpfung der Glycosidbindung

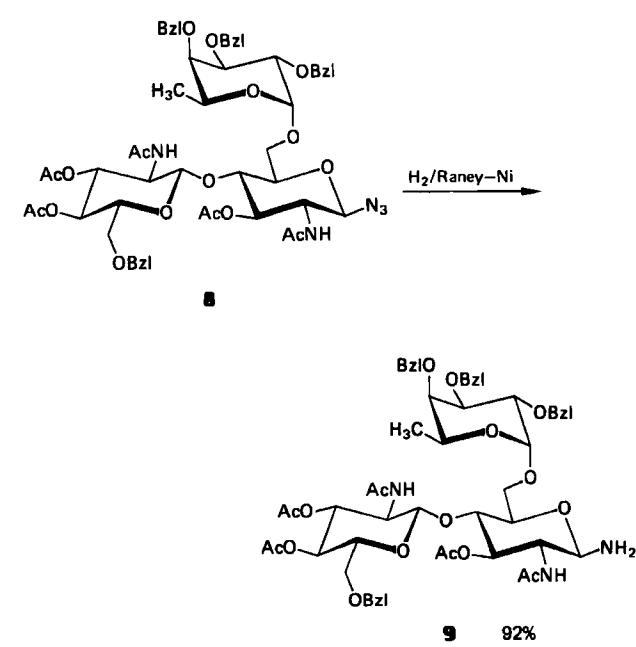
Die Herstellung der Glycosidbindungen zu den „richtigen“ Aminosäuren stand bis Anfang der achtziger Jahre im Mittelpunkt der Glycopeptidchemie. Besonders verdient gemacht haben sich *Jeanloz* und seine Mitarbeiter<sup>[38]</sup> damit, daß sie versuchten, eine gezielte Synthese von Glycopeptiden als Standardverbindungen für den Abbau von Glycoproteinen zu entwickeln. Da die Versuche, *N*- und *O*-Glycosylaminosäure-Derivate zu synthetisieren, in zwei Zusammenfassungen von 1985<sup>[30]</sup> und 1983<sup>[31]</sup> ausführlich behandelt wurden, werden hier nur die wichtigeren Verfahren mit neueren Entwicklungen verglichen.

##### 4.1. Die Asparagin-Glucosamin-Bindung

Die für die zellbiologisch besonders bedeutsamen *N*-Glycoproteine charakteristische  $\beta$ -*N*-glycosidische Bindung zwischen *N*-Acetylglucosamin und Asparagin (Typ 1), z.B. im Konjugat 7, wird durch Kondensation *N*-geschützter Asparaginsäure- $\alpha$ -monoester mit 2-Acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- $\beta$ -D-glucopyranosylamin 6 hergestellt (DCC = *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid)<sup>[39]</sup>. 6 wird aus dem Glucosylchlorid 4<sup>[40]</sup> über das Azid 5<sup>[41]</sup> gewonnen<sup>[30,31]</sup>. Zur Umwandlung des Chlorids 4 in das Azid 5 ist Natriumazid in Formamid<sup>[42]</sup> besser geeignet als das früher ausschließlich verwendete Silberazid<sup>[39,41]</sup>. In der komplexeren Chitobioserie blieb dieses Verfahren jedoch erfolglos. Hier konnte das heikle Silberazid<sup>[43]</sup> durch Natriumazid in Chloroform/Wasser unter Phasentransferbedingungen ersetzt werden<sup>[44]</sup>.

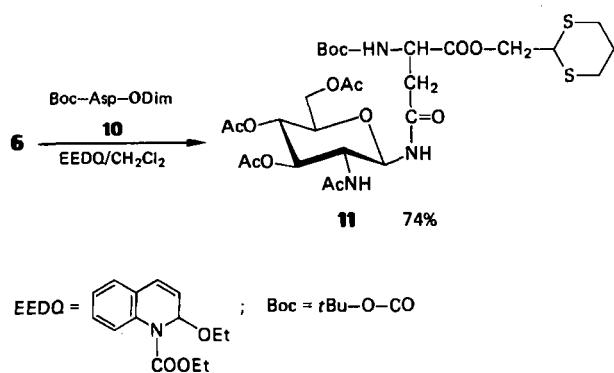


Die Hydrierung der Glucosylazide in der *N*-Acetylglucosaminreihe gelang bisher nur mit Platin-Katalysatoren befriedigend<sup>[30]</sup>. Als Nebenprodukte entstehen Bisglucosamine<sup>[45]</sup>. Unsere neueren Untersuchungen zeigen aber, daß diese Hydrierungen auch mit Raney-Nickel als Katalysator sehr effektiv sind<sup>[46]</sup>. Dieses Verfahren hat den Vorteil, daß Benzyl-Schutzgruppen nicht angegriffen werden. Beispielsweise gelingt die selektive Reduktion der Azido-Gruppe im komplexen, vollgeschützten Trisaccharid 8 unter Bildung des Amins 9 nahezu quantitativ<sup>[47]</sup>.



Zur Kondensation der Glycosylamine vom Typ 6 mit *N*-geschützten Asparaginsäure- $\alpha$ -monoestern zu *N*-Glycosyl-asparagin-Derivaten vom Typ 7 wurde zunächst nur Di-cyclohexylcarbodiimid verwendet<sup>[30,31,39]</sup>. Um die Probleme der späteren selektiven Deblockierung zu umgehen, setzten *Garg* und *Jeanloz*<sup>[48]</sup> sowohl das Glucosaminylamin 6 als auch das entsprechende Chitobiosylamin mit *N*-Ben-

zyloxykarbonyl(Z)-asparaginsäureanhydrid um. Sie erhielten dabei aber stets Gemische aus den gewünschten N-Glycosylasparagin-Derivaten und den Isomeren, in denen die  $\alpha$ -Carboxygruppe N-gebunden ist. Die Ausbeuten an gewünschtem Isomer sind nach diesem Verfahren unbefriedigend. Als Kondensationsmittel hat sich in unseren Versuchen besonders das Ethyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolin-1-carboxylat (EEDQ)<sup>[49]</sup> bewährt. Damit läßt sich z. B. **10**, der (1,3-Dithianyl)methyl(Dim)-ester<sup>[50]</sup> der tert-Butyloxycarbonyl(Boc)-asparaginsäure, glatt mit **6** zum N<sup>4</sup>-Glucosaminylasparagin-ester **11** umsetzen, der für die selektive Deblockierung vorbereitet ist<sup>[51,82]</sup>.



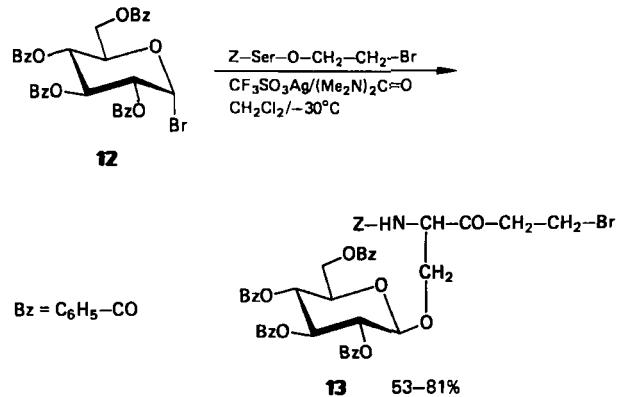
#### 4.2. Die $\beta$ -Glycosyl-Serin-Bindung

Die  $\beta$ -glycosidische Bindung zur Serin-Hydroxygruppe ist in Form des Xylose-Derivats **2** für die Proteoglycane im Tierreich besonders charakteristisch. Im Pflanzenreich und bei Pilzen treten jedoch auch andere Kohlenhydratbausteine als Verknüpfungspartner auf, so daß die Betrachtung dieses Bindungstyps nicht auf die Xylose beschränkt bleiben soll. Das ist um so mehr gerechtfertigt, als die chemischen Eigenschaften dieser Bindung nur wenig von der Art des Kohlenhydratbausteins beeinflußt werden. Die ersten Synthesen derartiger Glycosylserin-Verbindungen wurden über Dihydrooxazol-Derivate von Glucosamin ausgeführt<sup>[52]</sup>. Ähnlich ließen sich auch Kohlenhydrat-orthoester mit N-geschützten Serin- und Threonin-estern zu den entsprechenden Glycosiden umsetzen<sup>[53]</sup>. Xylosylserin-Konjugate wurden von Lindberg et al.<sup>[54,55]</sup> unter Koenigs-Knorr-Bedingungen erhalten.

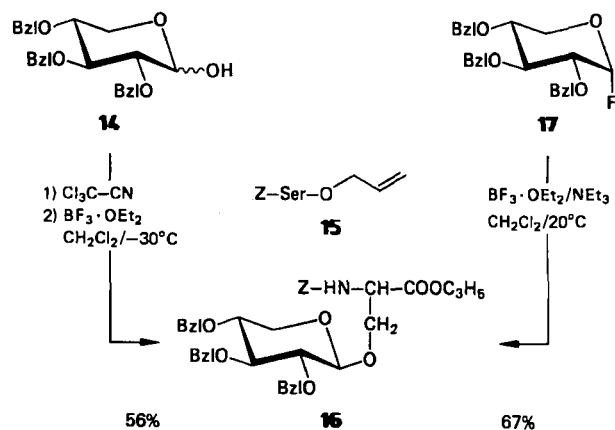
Näheres zu den vielen  $\beta$ -Glycosylserin- und -threonin-Derivaten, die unter Koenigs-Knorr- oder Helferich-Bedingungen hergestellt wurden, findet man in den ausführlichen Übersichten<sup>[30,31]</sup>. Mit diesen Methoden war man auch bei der Synthese von Galactosyl- $\delta$ -hydroxylysine-Modellverbindungen erfolgreich<sup>[56]</sup>.

Die moderneren Varianten der Koenigs-Knorr-Reaktion eignen sich ebenfalls zur Glycosylierung der Serin-Hydroxygruppe. So ließ sich z. B. Z-Serin-2-brommethylester<sup>[57]</sup> mit dem  $\alpha$ -D-Glucopyranosylbromid **12** in Gegenwart von Silbertrifluormethansulfonat/Tetramethylammonium<sup>[58]</sup> zum voll geschützten Glucosylserin-Derivat **13** umsetzen<sup>[59]</sup>. Interessant ist, daß das Halogenatom der Brommethylgruppe unter diesen Bedingungen nicht angegriffen wird.

Auch moderne Alternativen zur Koenigs-Knorr-Synthese<sup>[37]</sup> haben sich bei der Herstellung der Serin-Glycoside-Bindung bewährt. So ließ sich die Xylopyranose **14** nach



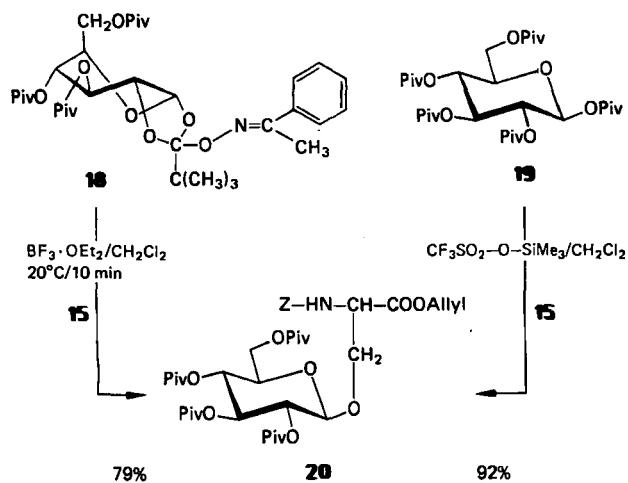
dem Trichloracetimidat-Verfahren<sup>[37,60]</sup> mit dem Z-Serin-allylester **15** in zufriedenstellender Ausbeute und Selektivität zum im Kohlenhydratteil etherartig geschützten Xylosylserin-Derivat **16** umsetzen<sup>[61]</sup>. Ebenfalls **16** erhält man bei der Reaktion des benzylgeschützten Xylopyranosylfluorids **17** mit dem Serin-ester **15** in Gegenwart von Bortrifluorid-Ether und Triethylamin<sup>[62]</sup>. Beide Reaktionen haben den Vorteil, daß sie rasch und in homogener Phase ablaufen. Es entsteht jedoch in beiden Fällen im Verhältnis von ca. 1 : 6 auch das **16** entsprechende  $\alpha$ -Isomer, das chromatographisch abgetrennt werden muß.



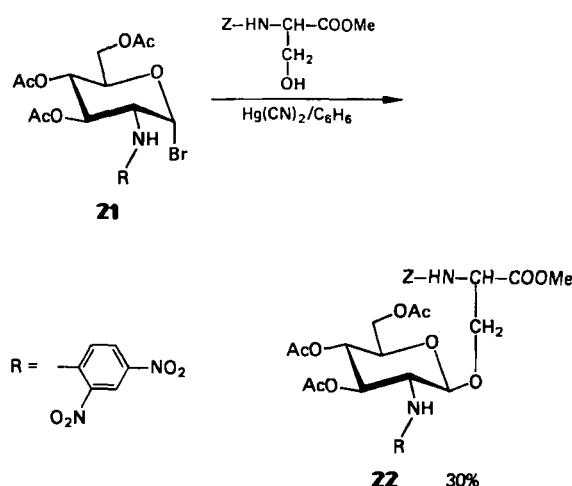
Hoch stereoselektiv verläuft die Glycosylierung aber mit O-acylgeschützten Glycosylfluoriden<sup>[62]</sup>. Die dabei gebildeten Produkte, z. B. **20**, werden ebenfalls sehr effektiv und unter homogenen Bedingungen erhalten, wenn man vom neuartigen Orthoester **18** mit einem Oximstrukturlement ausgeht<sup>[63]</sup>. Schließlich läßt sich **15** sehr glatt glycosylieren, indem die Pentapivaloylglucose **19**<sup>[64]</sup> als 1-O-Acyl-Zucker mit Trimethylsilyltrifluormethansulfonat<sup>[65]</sup> umgesetzt wird. Das Glucokonjugat **20** bildet sich stereoselektiv und fast quantitativ<sup>[66]</sup>.

#### 4.3. Die $\alpha$ -glycosidische Serin/Threonin-N-Acetylgalactosamin-Bindung

Die Herstellung der  $\alpha$ -O-glycosidischen Verknüpfung zwischen N-Acetylgalactosamin und Serin oder Threonin (Strukturtyp 3), die für viele Serum- und Membranglycoproteine charakteristisch ist, bereitete zunächst große Schwierigkeiten. In der entsprechenden Gluco-Reihe erga-

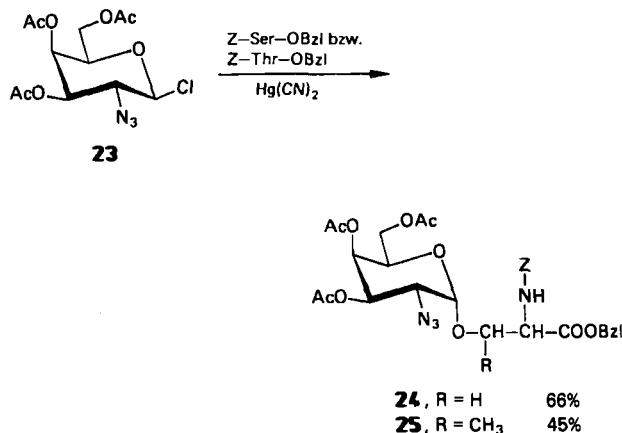


ben selbst an C-2 nicht nachbargruppenaktiv substituierte Glycosyldonoren wie das *O*-acetylierte 2-Desoxy- $\alpha$ -D-glycopyranosylbromid **21** mit Z-Serinmethylester unter Koenigs-Knorr- oder Helperich-Bedingungen praktisch ausschließlich die  $\beta$ -Glycosylaminosäure-Derivate, z. B. **22**<sup>[67]</sup>.

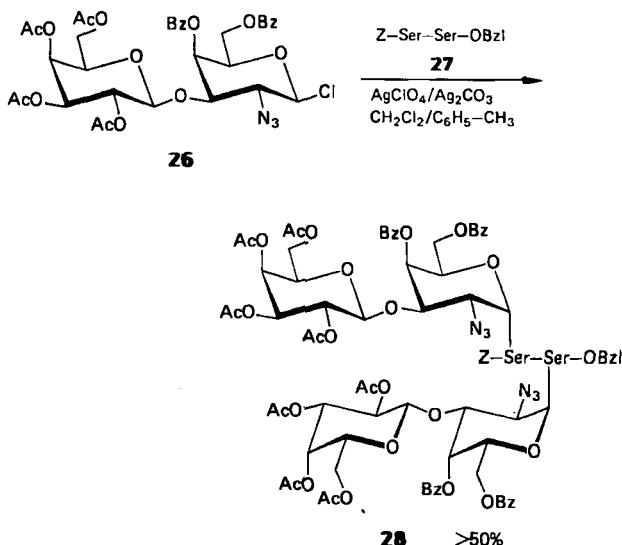


Die Lösung dieses Problems fanden *Paulsen et al.*<sup>[68]</sup>: Sie verwendeten als Glycosyldonoren reaktive  $\beta$ -Glycosylchloride mit dem 2-Azido-Substituenten als nicht nachbargruppenaktivem Substituenten unter den Bedingungen der „*in-situ*-Anomerisierung“. Dies wurde von *Ferrari und Pavia*<sup>[69]</sup> auf die Serin- und die Threonin-Glycosylierung übertragen, indem sie das geschützte 2-Azido- $\beta$ -galactosylchlorid **23** mit Z-Serin- bzw. -Threonin-methylester zu den Glycopeptiden **24** bzw. **25** umsetzen, die Vorläufer des Typ 3 sind.

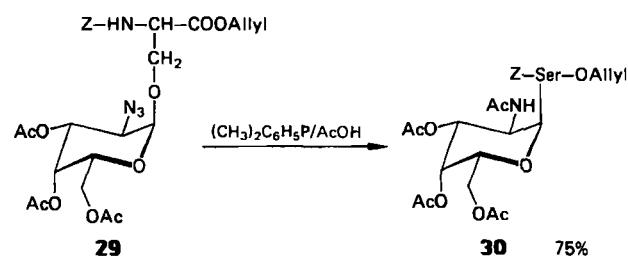
Das Azid-Verfahren<sup>[68]</sup> profitiert weiterhin davon, daß 2-Azido-glycosylhalogenide wie **23** durch die Azidonitratisierung<sup>[70]</sup> einfach zugänglich wurden. Auf dieser Basis haben *Paulsen et al.* mit dem Reagenssystem Silberperchlorat/Silbercarbonat in Dichlormethan/Toluol<sup>[71]</sup> effektive  $\alpha$ -Glycosylierungsverfahren ausgearbeitet. Die simultane  $\alpha$ -glycosidische Anknüpfung zweier Disaccharid-Einheiten an das Serylserin-Derivat **27** mit dem Glycosylhalogenid **26** illustriert die Leistungsfähigkeit dieser Methode<sup>[72a,b]</sup>.



Die selektive Reduktion der Azidogruppe in komplexen Glycopeptiden wie **28** gelingt mit Nickel-tetrahydridoborat<sup>[72]</sup> und ergibt nach Acetylierung der gebildeten Aminogruppe Glycopeptide, die dem Strukturtyp 3 entsprechen und Partialstrukturen aus Glycoproteinen vom tumorassoziierten T-Antigen-Typ sind. Die Azidogruppe in Verbindungen wie **24**, **25** oder **28** kann auch mit Schwefelwasser-



stoff<sup>[73,74]</sup> reduziert werden. Mit Dimethyl(phenyl)phosphan in wasserfreiem Eisessig gelingt es, die Azidogruppe in den basenempfindlichen Glycosylserin- und -threonin-Derivaten, z. B. **29**, direkt in die Acetamidogruppe (z. B. **30**) umzuwandeln<sup>[75]</sup>.



$\alpha$ -Glycoside von 2-Azido-2-desoxy-galactopyranose mit Serin-Derivaten werden auch nach dem Trichloracetimidat-Verfahren erhalten<sup>[76]</sup>. Eine weitere  $\alpha$ -Glycosidsynthese ohne Quecksilber- oder Silberreagentien basiert auf

der Aktivierung der freien anomeren Hydroxygruppe von benzylgeschützten Kohlenhydratbausteinen mit Trifluormethansulfonsäureanhydrid<sup>[77]</sup>. Wiederum unter Verwendung des Azido-Derivats ließ sich das Verfahren auf die Synthese der  $\alpha$ -Galactosaminylserin- und -threonin-Derivate anwenden<sup>[78]</sup>. Besonders bei der Glycosylierung von Threonin-Derivaten entstehen auch merkliche Mengen des  $\beta$ -Anomers, die abgetrennt werden müssen.

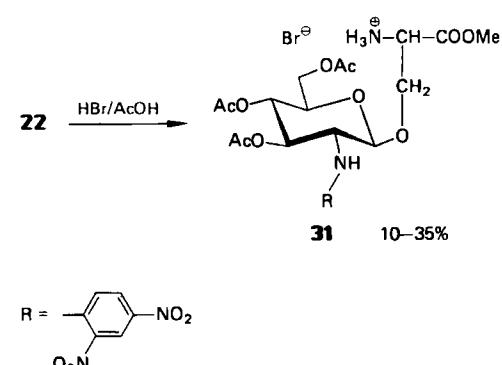
## 5. Die selektive Deblockierung und die Peptidkettenverlängerung an Glycopeptiden

Die selektive Abspaltung von Schutzgruppen an Glycosylaminosäuren und Glycopeptiden war bis zum Ende des vorigen Jahrzehnts ein ungelöstes Problem<sup>[30,31]</sup>. Nur in Einzelfällen und unter großen Substanzerlusten<sup>[67]</sup> konnte eine bestimmte funktionelle Gruppe der polyfunktionellen Glycopeptide gezielt deblockiert werden; die Ursache dieser Schwierigkeiten liegt in der Anwesenheit von Glycosidbindungen in den Molekülen (siehe Abschnitt 3). Da Verfahren zur Überwindung dieser Hindernisse erst in den letzten Jahren gefunden und im Gegensatz zu Oligosaccharidsynthesen<sup>[36,37]</sup> und zur Glycosylierung von Aminosäure-Derivaten<sup>[30,31]</sup> noch nicht ausführlich referiert wurden und da unsere Arbeitsgruppe an der Lösung dieser Problematik intensiv beteiligt war<sup>[32]</sup>, wird dieser Aspekt der Glycopeptidsynthese den Schwerpunkt dieser Übersicht bilden.

### 5.1. Die Labilität von Glycosidbindungen

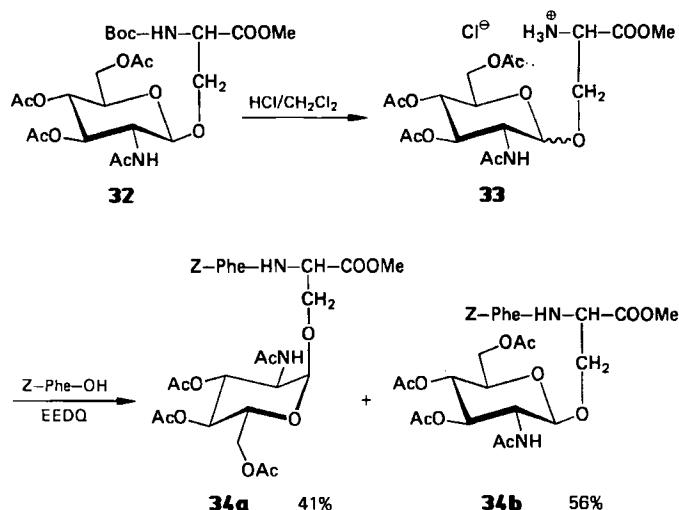
Die Glycosidbindungen der Glycopeptide sind als Acetalbindungen immer mehr oder weniger säureempfindlich. Am stabilsten gegen Säuren sind die *N*-Glycoside vom Typ 1 und die Glycose-Derivate von  $\delta$ -Hydroxylysine. Jedoch enthalten auch oligosaccharidische Glycopeptide mit diesen relativ stabilen Verknüpfungsstrukturen interglykosidische Bindungen über Sauerstoff, so daß die an den folgenden Beispielen veranschaulichte Empfindlichkeit gegenüber Säuren im Prinzip auch für solche Glycopeptide gilt.

Beim Versuch, die Z-Gruppe aus dem Glycosylserin-Derivat 22 mit Bromwasserstoff in Eisessig selektiv abzuspalten, wurde vorwiegend die Glycosidbindung geöffnet<sup>[67]</sup>.



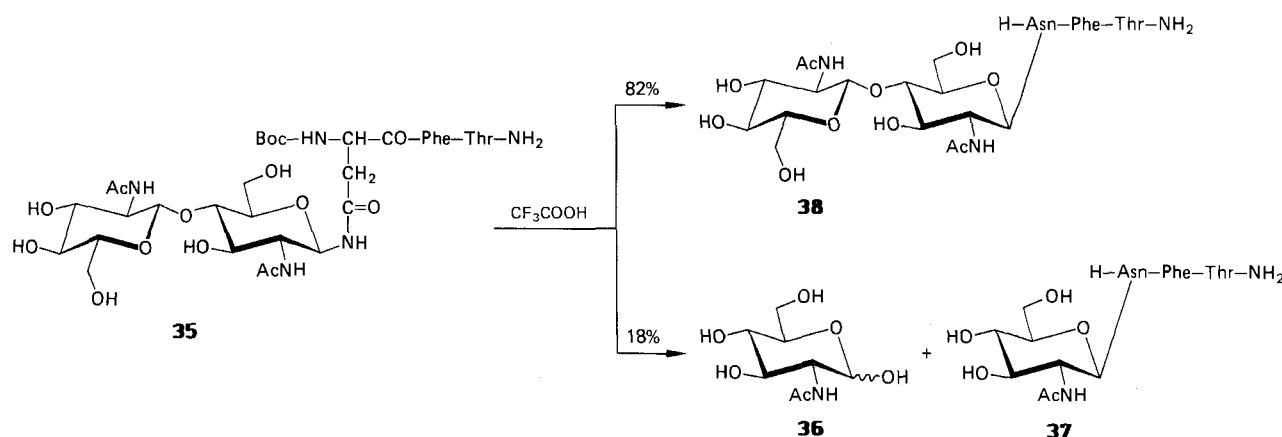
Das daneben noch erhaltene, nicht charakterisierte Ammoniumsalz 31 ergab nach *N*-terminaler Kettenverlängerung mit Z-Aminosäure-*p*-nitrophenylestern die entsprechenden Glycodipeptide in 12–34% Ausbeute bezogen auf 22.

Sind in der Lösung nur schwächere Nucleophile anwesend, wird die Spaltung der Glycosidbindung zurückgedrängt. Dann besteht aber immer noch die Gefahr der Anomerisierung, wie wir sie bei der Abspaltung der Boc-Gruppe aus 32 beobachtet haben<sup>[32,79]</sup>. Die *N*-terminale Kettenverlängerung mit Z-Phenylalanin zu 34 offenbarte, daß das aminodeblockierte Zwischenprodukt 33 als Mischung beider Anomere vorlag: Die anomeren Glycodipeptide 34a und 34b, die sich chromatographisch sehr ähnlich verhalten, konnten getrennt und strukturell eindeutig charakterisiert werden<sup>[79]</sup>. Dagegen wurde bei einer

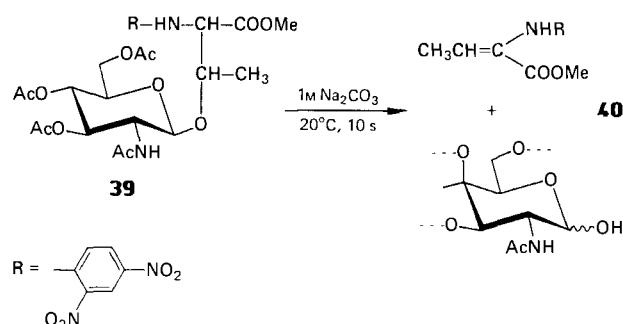


Glycopeptidsynthese nach dem Festphasenverfahren mit Boc als Schutzgruppe die Abspaltung vom Harz sogar mit Fluorwasserstoff in Anisol durchgeführt<sup>[80]</sup>, ohne daß die *O*-glycosidische Bindung gelöst wurde. Dies ist überraschend, denn Fluorwasserstoff greift normalerweise Oligosaccharide und sogar 1-*O*-Acyl-monosaccharide sehr schnell an<sup>[62]</sup>. Immerhin zeigen neuere Arbeiten, daß die Labilität der *O*-glycosidischen Bindung von der Struktur der Glycopeptide abhängen scheint. Sinay et al.<sup>[81]</sup> konnten *tert*-Butylester von *O*-Glycopeptiden selektiv mit Trifluoressigsäure unter Erhaltung der Glycosidbindung spalten. Dennoch kann auch die wenig nucleophile Trifluoressigsäure Glycosidbindungen trennen, z. B. beim Chitobiostriptopeptid 35. Das gewünschte 38, eine Partialstruktur aus dem menschlichen Komplementfaktor B, und seine Spaltungsprodukte 36 und 37 entstehen im Verhältnis 9 : 2<sup>[44,82]</sup>. Im Kohlenhydratteil acylgeschützte Analoga zu 35 werden von Trifluoressigsäure nicht an der interglykosidischen Bindung angegriffen<sup>[44]</sup>. Diese unterschiedlichen Erfahrungen machen deutlich, daß die acidolytische Schutzgruppenspaltung in der Glycopeptidsynthese für jeden Einzelfall überprüft werden muß.

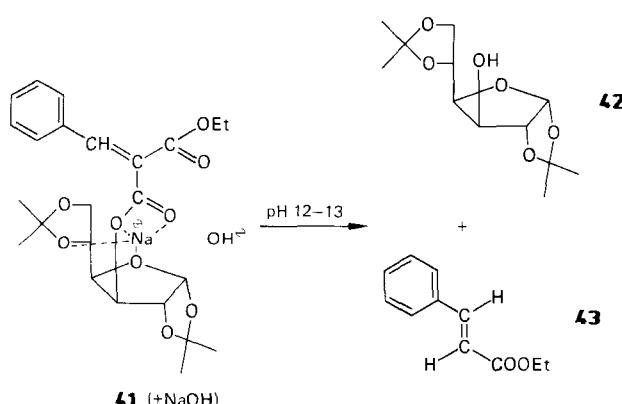
Die Synthese von Glycopeptiden des Glycosylserin- und -threonin-Typs (2 oder 3) wird darüber hinaus durch die charakteristische Basenlabilität der *O*-Glycosyl- $\beta$ -hydroxy-carbonsäure-Derivate erschwert<sup>[83]</sup>. Diese Labilität wird analytisch zum Nachweis von *O*-Glycosylserin- bzw. -threonin-Bindungen in Glycoproteinen genutzt<sup>[84]</sup>. Beispielsweise wird die Glycosidbindung im geschützten Glycosylthreonin-methylester 39 in Natriumcarbonatlösung viel schneller quantitativ zerstört, als der Methylester gespalten wird<sup>[85]</sup>. Die Geschwindigkeit der  $\beta$ -Eliminierung



zu  $\alpha$ -Aminoacrylsäure-Derivaten wie **40** ist abhängig von der Struktur der Glycokonjugate, insbesondere von den Substituenten an der Amino- und der Carboxygruppe des Aminosäureteils. Ester und Amide zersetzen sich bei Raumtemperatur schon bei pH-Werten von neun merklich<sup>[85]</sup>.



Da in der Peptidsynthese als Benzyl- oder *tert*-Butylether geschützte Serin- und Threonin-Derivate sehr gebräuchlich und stabil sind, ist die leichte  $\beta$ -Eliminierung des Kohlenhydrateteils in Verbindungen wie **39** auf den ersten Blick überraschend. Sie wird verständlich, wenn man das Komplexierungsvermögen der Kohlenhydrate gegenüber Kationen und Aminen berücksichtigt, das z. B. bei der Verseifung des unsymmetrischen Benzyliden-malonsäurediesters **41** dazu führt, daß nur der sekundäre Kohlenhy-



dratester gespalten wird<sup>[86]</sup>. Diesem Komplexierungsvermögen verdanken die Peptidoylkohlenhydrate ihre Aktivestereigenschaften, die sich biologisch bedeutsam im

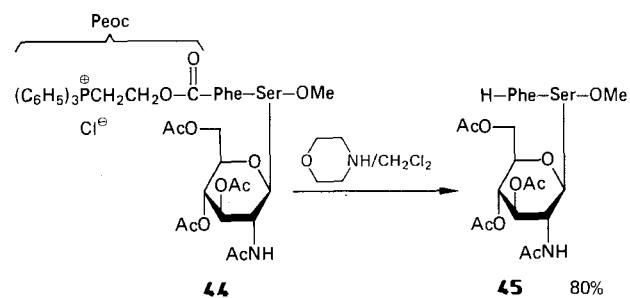
Peptidyltransferschritt von der P-site-gebundenen Peptidyl-tRNA auf die A-site-gebundene Aminoacyl-tRNA dokumentieren<sup>[87]</sup>.

Die Basenlabilität und die potentielle Säurelabilität der Glycopeptide machen es erforderlich, daß in der Synthese dieser Verbindungen Schutzgruppen verwendet werden, die unter milden, möglichst neutralen Bedingungen abgelöst werden können. Früher genügten nur die Benzyl- und die Z-Gruppe diesen Anforderungen<sup>[30,31]</sup>. Da sie aber bei der Hydrogenolyse gleichzeitig abgespalten werden, mußten sie für selektive Deblockierungen mit Schutzgruppen wie der Methylgruppe kombiniert werden, die wiederum nicht ohne Zerstörung der Glycosidbindung entfernt werden konnten (vgl. z. B. **39**  $\rightarrow$  **40** und<sup>[54,67]</sup>). Dieses Problem war nur durch Einführung neuer Schutzgruppen und durch Anwendung anderer, bereits bekannter Schutzgruppen auf die Glycopeptidsynthese zu lösen.

## 5.2. Die Phosphonioethoxycarbonyl(Peoc)-Schutzgruppe

Da sich die 2-Triphenylphosphonioethoxycarbonyl(Peoc)-Schutzgruppe<sup>[88]</sup> bereits unter sehr milden basischen Bedingungen von Aminogruppen ablösen läßt, haben wir sie in unseren ersten Glycopeptidsynthesen eingesetzt<sup>[89]</sup>. Sie ermöglicht den gezielten Aufbau von N-Glycopeptiden in Kombination sowohl mit der C-terminalen Benzyl- als auch mit der *tert*-Butylgruppe. Zur Kettenverlängerung kann dank der hohen Säurestabilität der Peoc-Gruppe auch mit den sogar bei Raumtemperatur stabilen Peoc-Aminosäurechloriden<sup>[90]</sup> gearbeitet werden.

Die Abspaltungsbedingungen für die Peoc-Gruppe mit Morpholin in Dichlormethan sind so schonend, daß auch die basenlabile O-Glycosylserin-Bindung vollständig intakt bleibt, so z. B. bei der Deblockierung des Glycodipeptids **44**<sup>[91]</sup>. Die Estergruppen und die zu Eliminierungen



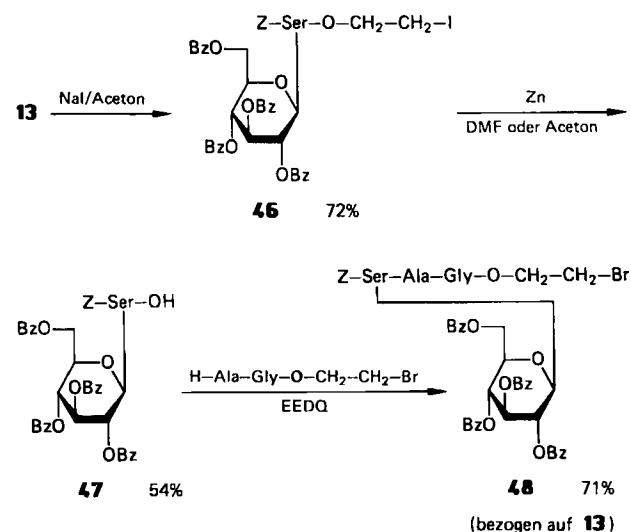
neigenden *O*-Glycosidbindungen bleiben unversehrt, so daß an der nicht mehr geschützten Aminogruppe von **45** die Peptidkette gezielt verlängert werden kann<sup>[91]</sup>.

Trotz der Vorteile der Peoc-Gruppe, die in Kombination mit der leicht abspaltbaren Benzylgruppe erstmals eine saubere, selektive Aminodeblockierung an Glycopeptiden zuließ<sup>[89]</sup>, stehen ihrer allgemeinen Anwendung in der Glycopeptidsynthese einige Nachteile entgegen: 1. Die Peoc-Gruppe ist ein voluminöser Substituent, der die Kondensationsreaktionen erschwert. 2. Die hohe Basenlabilität der Schutzgruppe, derer wegen sie unter milden Bedingungen abgelöst wird, erfordert besondere Aufmerksamkeit bei den Synthesen. 3. Die Peoc-Schutzgruppe ist ein kationischer Substituent, dessen Halogenid-Gegenionen Glycosylierungen mit Silber- und Quecksilber-Reagentien stören. Deshalb muß z. B. beim Aufbau der Glycopeptidstruktur **44** im Glycosylierungsschritt die Z-Gruppe verwendet werden<sup>[91]</sup>. Um sie selektiv abspalten zu können, mußte aber C-terminal der Methylester eingesetzt werden, dessen Spaltung nicht mehr ohne Zerlegung der Glycosidbindung durch  $\beta$ -Eliminierung<sup>[54, 85]</sup> (siehe Abschnitt 5.1) zu erreichen ist. Daraus wird ersichtlich, daß für eine erfolgreiche Glycopeptidsynthese auch Alternativen zur Benzylgruppe als Carboxyschutzgruppe erforderlich waren.

### 5.3. Die 2-Halogenethylgruppe als Carboxyschutzgruppe

Die 2-Bromethylgruppe wurde erstmals von *Ugi et al.*<sup>[92]</sup> als reversible Carboxyschutzgruppe für Peptidsynthesen beschrieben; abgespalten wurde sie mit einem superno-cleophilen Cobalt(I)-Komplex. Wir hatten versucht<sup>[57]</sup>, die Brommethoxycarbonyl(Beoc)-Gruppe, eine Vorstufe der Peoc-Gruppe<sup>[93]</sup>, als Carboxyschutzgruppe zu verwenden, und dabei festgestellt, daß 2-Chlor- und 2-Bromylester von Aminosäuren und Peptiden nach Umwandlung in die Iodethylester mit Zink in Dimethylformamid (DMF) selektiv gespalten werden können. Diese neutrale Deblockierungsreaktion eröffnete erstmals die Möglichkeit, am sauer- und basenlabilen Glycosylserin-Derivat **13** selektiv die Carboxygruppe freizulegen<sup>[59]</sup>. Der Glycosylserin-2-iodethylester **46** und das carboxydeblockierte Produkt **47** konnten isoliert und charakterisiert werden. Führt man die Kettenverlängerung mit den Rohprodukten von **46** und **47** durch, so erhält man das Glycotripeptid **48** in 71% Ausbeute bezogen auf **13**<sup>[94]</sup>, ohne daß die Esterschutzgruppen im Kohlenhydratteil, die *N*-terminale Z-Schutzgruppe oder die eliminierungsgefährdete *O*-glycosidische Bindung beeinträchtigt würden.

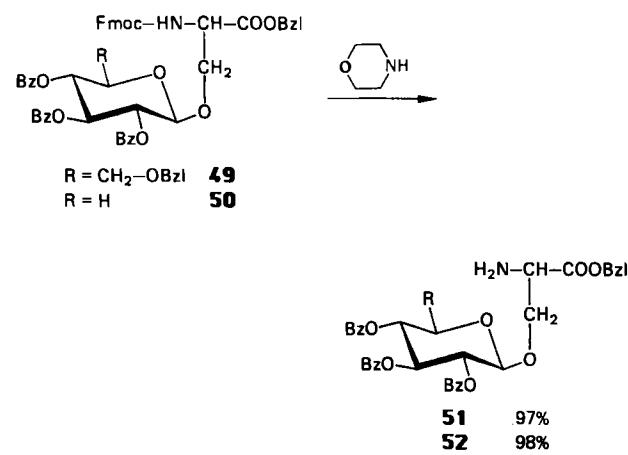
Die Ausbeuteverluste im Deblockierungsschritt sind darauf zurückzuführen, daß **47** zum Teil an die gebildeten Zinksalze adsorbiert ist und wegen der Säure- und Basenlabilität der Serin-Glucose-Bindung nicht durch entsprechende Aufarbeitung von ihnen getrennt werden kann. Abhilfe ist möglich, indem man 2-Bromylester elektrochemisch spaltet<sup>[95, 96]</sup>. Der einzige Nachteil dieser Methode liegt in den apparativen Voraussetzungen, die nicht allorts gegeben sein werden.



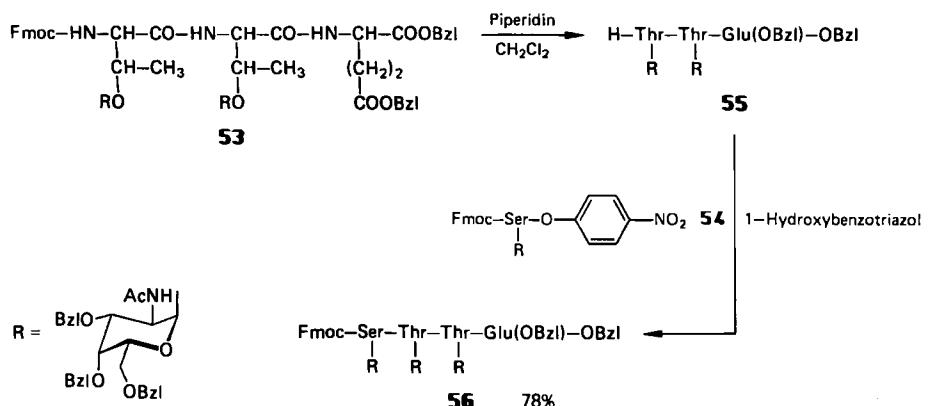
Die Bromethylgruppe<sup>[59, 94, 96]</sup> und die Peoc-Gruppe<sup>[89, 91]</sup> gestatteten erstmals zusammen mit dem reversiblen Schutz durch Z- oder Benzylgruppe die effektive, selektive Deblockierung und Kettenverlängerung selbst an den empfindlichen *O*-Glycosylserin-Derivaten. Die genannten Nachteile machten dennoch die Erprobung weiterer Methoden notwendig. So erschien es besonders lohnend, eine Schutzgruppe für die Glycopeptidsynthese zu finden, die unter ähnlich milden Bedingungen abspaltbar ist wie die Peoc-Gruppe, jedoch nicht durch eine kationische Struktur die Glycosylierungsreaktion beeinträchtigt. Diese Anforderungen erfüllt die (9-Fluorenyl)methoxycarbonyl-(Fmoc)-Schutzgruppe<sup>[97]</sup>.

### 5.4. Die (9-Fluorenyl)methoxycarbonyl(Fmoc)-Schutzgruppe

Die neutrale Fmoc-Gruppe<sup>[97]</sup> ist etwas weniger basenlabil als die Peoc-Gruppe. Dennoch konnten wir zeigen, daß aus den zur basenkatalysierten  $\beta$ -Eliminierung neigenden geschützten *O*-Glucosyl- und *O*-Xylosylserin-Derivaten **49** bzw. **50** die Fmoc-Gruppe völlig selektiv und praktisch quantitativ abgespalten werden kann<sup>[98]</sup>. Anders als in der Peptidchemie üblich und auch anders als *Pavia et al.*<sup>[78, 99]</sup>, die ebenfalls den Einsatz der Fmoc-Gruppe in der Glycopeptidsynthese beschrieben, verwenden wir nicht das relativ stark basische Piperidin ( $pK_s \approx 11.1$ ), sondern das



[\*] In einigen Fällen werden die Kohlenhydrate mit Haworth-Formeln wiedergegeben, da sich diese beispielsweise besser für  $\beta$ -Glycoside zusammen mit Kurzbezeichnungen der Aminosäuren eignen.



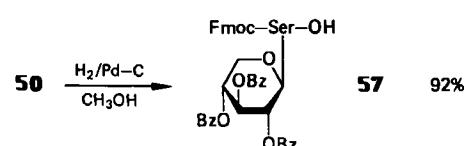
Schema 1.

um Größenordnungen schwächer basische Morpholin ( $pK_s \approx 8.3$ ), um die Fmoc-Gruppe zu entfernen. Damit ist sichergestellt, daß die Empfindlichkeitsgrenze, oberhalb der die Glycosidbindung durch  $\beta$ -Eliminierung zerstört wird, nicht erreicht wird<sup>[98]</sup>.

Ist das Problem der selektiven Deblockierung unter Erhaltung der vielen Estergruppen und der Glycosidbindung, z. B. in den Produkten **51** und **52**, gelöst, so bereitet der weitere Kettenaufbau keine Schwierigkeiten mehr. Auch aus komplexeren Glycopeptiden kann selektiv und effektiv die Fmoc-Gruppe mit Morpholin entfernt werden; dies unterstreicht die allgemeine Anwendbarkeit des Verfahrens<sup>[98]</sup>.

*Ferrari* und *Pavia*<sup>[100]</sup> setzen den Fmoc-Rest in Kombination mit Aktivestern ein, wobei sie im Kohlenhydratteil Benzyl-Schutzgruppen verwenden. So bauten sie die *N*-terminalen Triglycopentapeptide aus menschlichem Glycophorin mit M- und N-Blutgruppenstruktur in der monosaccharidischen T<sub>N</sub>-Antigen-Form<sup>[101]</sup> auf. Einen typischen Ausschnitt der Synthese gibt Schema 1 wieder.

Die in diesen Beispielen gezeigte Leistungsfähigkeit der kombinierten Anwendung von Fmoc- und Benzylgruppe wird nur dadurch beeinträchtigt, daß die Fmoc-Gruppe bei der hydrogenolytischen Spaltung des Benzyesters nicht zuverlässig stabil ist<sup>[102]</sup>. Unsere eigenen Versuche ergaben aber, daß der Fmoc-*O*-Xylosylserin-benylester **50** hydrogenatisch selektiv C-terminal zu **57** gespalten werden kann<sup>[103]</sup>. Damit ist in Gegenwart der Fmoc-Gruppe auch die selektive, C-terminale Kettenverlängerung und die Synthese größerer Glycopeptideinheiten, z. B. nach dem Fragmentkondensationsverfahren<sup>[14]</sup>, möglich.

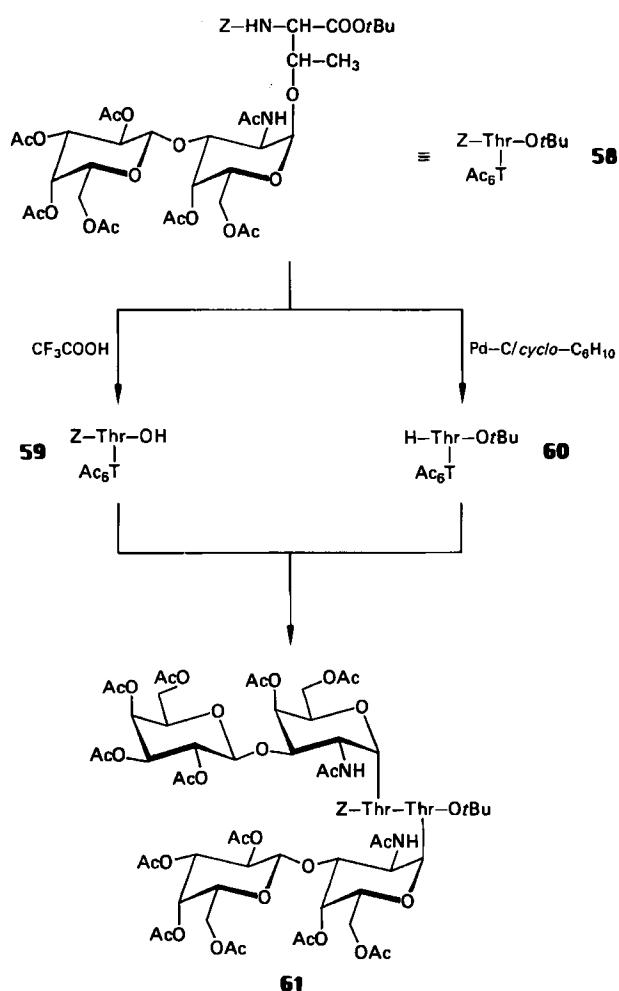


### 5.5. Die *tert*-Butyl-Schutzgruppe in der Glycopeptidsynthese

Trotz der Risiken, die mit der sauren Behandlung von Glycopeptiden verbunden sind (siehe Abschnitt 5.1), nutzen *Sinay* und *Verez Bencomo*<sup>[81]</sup> die selektive Abspaltung der *tert*-Butylgruppe in Gegenwart der Z-Gruppe zum Aufbau der *N*-terminalen Triglycopentapeptide mit der disaccharidischen T-Antigen-Struktur (T), die als tumorassozi-

ierte Antigenstruktur<sup>[8]</sup> bedeutsam ist<sup>[104]</sup>. So kann der vollgeschützte Z-Glycosylthreonin-*tert*-butylester **58** alternativ C-terminal zu **59** und *N*-terminal zu **60** deblockiert werden<sup>[81]</sup>. Die beiden selektiv deblockierten Verbindungen ergeben unter der Einwirkung von EEDQ das komplexe, vollgeschützte Glycodipeptid **61** mit der gleichen Schutzgruppenkombination wie das Edukt **58**. *Sinay* und *Verez Bencomo*<sup>[104]</sup> gelang mit dieser Technik auch der Aufbau der *N*-terminalen T-Antigen-Triglycopentapeptide aus dem Glycophorin. Experimentelle Einzelheiten dieser Synthese wurden bisher noch nicht veröffentlicht<sup>[81, 104]</sup>.

Im Gegensatz zu diesen Resultaten haben *Paulsen* et al.<sup>[74]</sup> Nebenreaktionen bei der *tert*-Butylester-Spaltung mit Trifluoressigsäure an einer mit **58** sehr ähnlichen Verbindung beobachtet. Sie setzten für deren Deblockierung des-



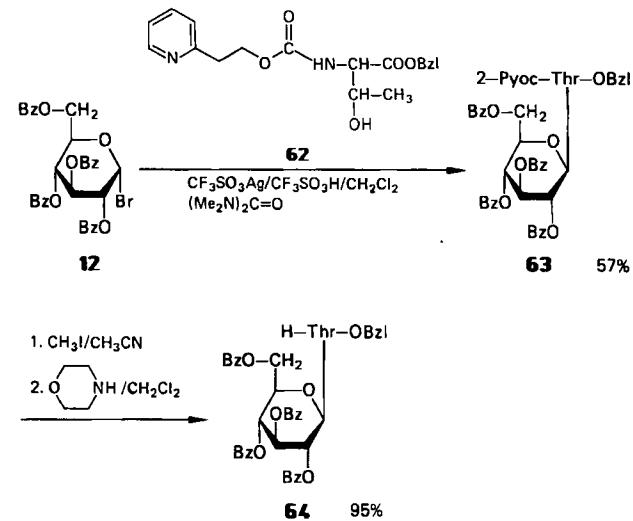
halb 98proz. Ameisensäure ein. Für das dabei nahezu quantitativ gebildete Produkt geben sie allerdings an, daß zwei Rotationsisomere der Z-Gruppe vorliegen.

An dieser Stelle soll kurz auf die Struktursicherung bei komplizierten Glycopeptiden eingegangen werden, die nur durch Hochfeld-NMR-Spektroskopie möglich ist. Als besonders schwierig erwies sich die Struktursicherung von  $\alpha$ -Galactosaminylthreonin-Derivaten wie **58** und **59**, denn in deren  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren unterscheiden sich die Verschiebungen der anomeren Kohlenstoffatome für das  $\alpha$ - und das  $\beta$ -Anomer nur wenig. Die Lösung dieses Problems haben Pavia et al.<sup>[77, 78, 100]</sup> gefunden. Sie erkannten, daß das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Signal der Thr- $\gamma$ -Methylgruppe eine sehr sensible Sonde für die anomere Konfiguration ist: Bei den  $\alpha$ -Anomeren findet man es bei  $\delta = 18\text{--}20$ , in den Spektren der analogen  $\beta$ -Anomere ist es um ca. 2 ppm hochfeldverschoben. Für den Einsatz der *tert*-Butyl-<sup>[74, 78, 104]</sup> und der Boc-Gruppe<sup>[80]</sup> bei der Synthese von *O*-Glycopeptiden ist schließlich zu beachten, daß in der Peptidsynthese zur Vermeidung von Nebenreaktionen durch *tert*-Butyl-Kationen oder *tert*-Butyl-trifluoracetat in der Regel nucleophile Abfangreagentien wie 1,2-Ethandithiol<sup>[106]</sup> zugesetzt werden müssen<sup>[107]</sup>. Dadurch wird bei der sauren Schutzgruppenablösung die Gefahr der Glycosidspaltung stark erhöht. In jedem Fall müssen die Auswirkungen von starken Protonierungsmitteln auf die empfindlichen Verbindungen sorgfältig geprüft werden. Diese Einschränkung gilt sogar für die stabileren *N*-Glycosylasparagin- **1** und *O*-Glycosyl- $\delta$ -hydroxylysins-Glycopeptide, wenn sie Oligosaccharidseitenketten enthalten; monosaccharidische Glycopeptide dieser Arten wurden erfolgreich unter Verwendung von *tert*-Butyl-<sup>[56]</sup> oder Boc-geschützten Aminosäuren, sogar in einer Festphasensynthese<sup>[108]</sup>, aufgebaut. Im Falle der an der Festphase synthetisierten Somatostatinsequenz wurde die Struktur jedoch nur massenspektrometrisch bestimmt<sup>[108]</sup>. Damit ist über die Stereochemie naturgemäß keine Aussage möglich. Will man die mit den sauren Deblockierungen verbundenen Unsicherheiten in der Glycopeptidsynthese ausschalten, muß man auf die unter milden Bedingungen abspaltbaren Schutzgruppen wie die Peoc-Gruppe und die Fmoc-Gruppe (Abschnitte 5.2-5.4) zurückgreifen. Deren Nachteile sind wiederum ihre permanente Empfindlichkeit sowie teilweise Löslichkeitsprobleme bei der Synthese größerer Glycopeptideinheiten. Um diese Nachteile zu umgehen und um den inneren Widerspruch zwischen geforderter Stabilität des Schutzes in der Synthese und ebenso geforderter Labilität der Schutzgruppe bei der Deblockierung zu lösen, haben wir auf das Prinzip der zweistufigen Schutzgruppe<sup>[109]</sup> zurückgegriffen.

## 5.6. Die 2-Pyridylethoxycarbonyl(Pyoc)-Schutzgruppe

Schutzgruppen, die sowohl gegen Säuren als auch gegen Basen sehr stabil sind und die sich dennoch nach einer einfachen Umwandlung unter sehr milden Bedingungen von der durch sie blockierten Aminogruppe ablösen lassen, sind die 2-(2-Pyridyl)ethoxycarbonyl(2-Pyoc)-<sup>[110]</sup> und die 2-(4-Pyridyl)ethoxycarbonyl(4-Pyoc)-Gruppe<sup>[111]</sup>. Bei der Glycosylierung des 2-Pyoc-Threonin-benzylesters **62** zu **63** mit dem benzoylgeschützten Glucopyranosylbromid **12**

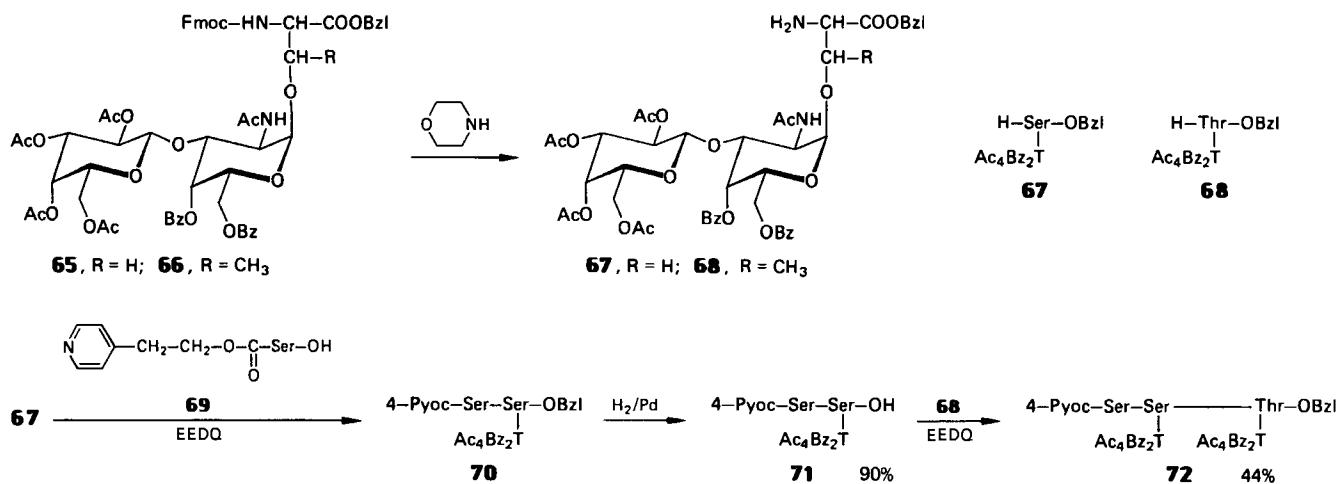
nach dem Silbertriflat-Verfahren<sup>[58]</sup> müssen molare Mengen Trifluormethansulfonsäure zugegeben werden, da sonst ausschließlich der entsprechende Orthoester gebildet wird<sup>[112]</sup>. Die selektive Abspaltung der stabilen Pyoc-Gruppe vom labilen Glycosylthreonin-Derivat **63** gelingt nach Methylierung des Pyridin-N-Atoms. Dadurch wird die  $\alpha$ -Methylengruppe so CH-acid, daß bereits mit Morpholin in Dichlormethan praktisch quantitativ **64** entsteht, dessen Kettenverlängerung somit möglich wird<sup>[112]</sup>.



Wegen der Begünstigung der Orthoesterbildung durch die Pyoc-Gruppe ist es vorteilhaft, für die Glycosylierung die Fmoc-Gruppe einzusetzen, um dann in den Kettenverlängerungsreaktionen die Vorteile der stabilen und löslichkeitsvermittelnden Pyoc-Gruppe zu nutzen. Dieses Kombinationsverfahren ist in Schema 2 für die Synthese des vollgeschützten, *N*-terminalen Diglycotripeptids **72** des Glycophorins mit M-Spezifität und der disaccharidischen T-Antigen-Struktur gezeigt<sup>[113]</sup>. Bei der selektiven Abspaltung der Fmoc-Gruppe mit Morpholin<sup>[98]</sup> bleiben auch in den disaccharidischen Glycosylserin- **65** und -threonin-Derivaten **66** die vielen Estergruppen und die sensiblen *O*-glycosidischen Bindungen erhalten. Die freien Aminoverbindungen **67** bzw. **68** neigen zur basenkatalysierten „Selbstzerstörung“. Sie werden deshalb sofort mit den 4-Pyoc-geschützten Carboxykomponenten **69** bzw. **71** umgesetzt zu **70** (51% bezogen auf **65**) bzw. **72**. Bei der Spaltung des Benzylesters **70** zeigt sich ein weiterer Vorteil der Pyoc-Gruppe: Sie ist stabil gegenüber der Hydrogenolyse.

Aus dem komplexen und empfindlichen Glycopeptid **72** kann die 4-Pyoc-Gruppe nach Überführung in die Pyridiniumform wiederum unter milden Bedingungen völlig selektiv abgelöst werden. Im basenempfindlichen Produkt **73** wird die freie Aminogruppe durch Acetylierung zu **74** (76% bezogen auf **72**) geschützt<sup>[113]</sup>.

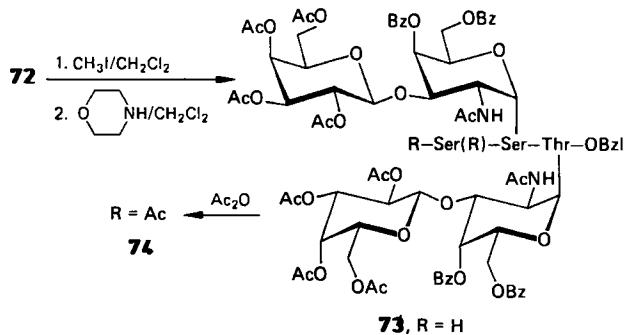
Diese und weitere Glycopeptidsynthesen<sup>[105, 112, 113]</sup> belegen die Leistungsfähigkeit des Pyoc-Verfahrens. Die einzige Einschränkung besteht darin, daß die Alkylierung zur Umwandlung der stabilen in die labile Schutzgruppenform in Gegenwart von alkylierbaren Aminosäuren, z. B. Cystein, nicht durchgeführt werden kann. Die ideale Schutzgruppe für die Glycopeptidsynthese sollte ähnlich stabil sein wie die Pyoc-Gruppe, aber dennoch unter mildesten



Schema 2.

Bedingungen abgespalten werden können, ähnlich wie die Pyridiniumform der Pyoc-Gruppe, ohne daß eine Umwandlungsreaktion nötig ist. Als Gruppen, die diesen Anforderungen genügen, fanden wir die Allyl-Schutzgruppen<sup>[44, 61, 114, 115]</sup>.

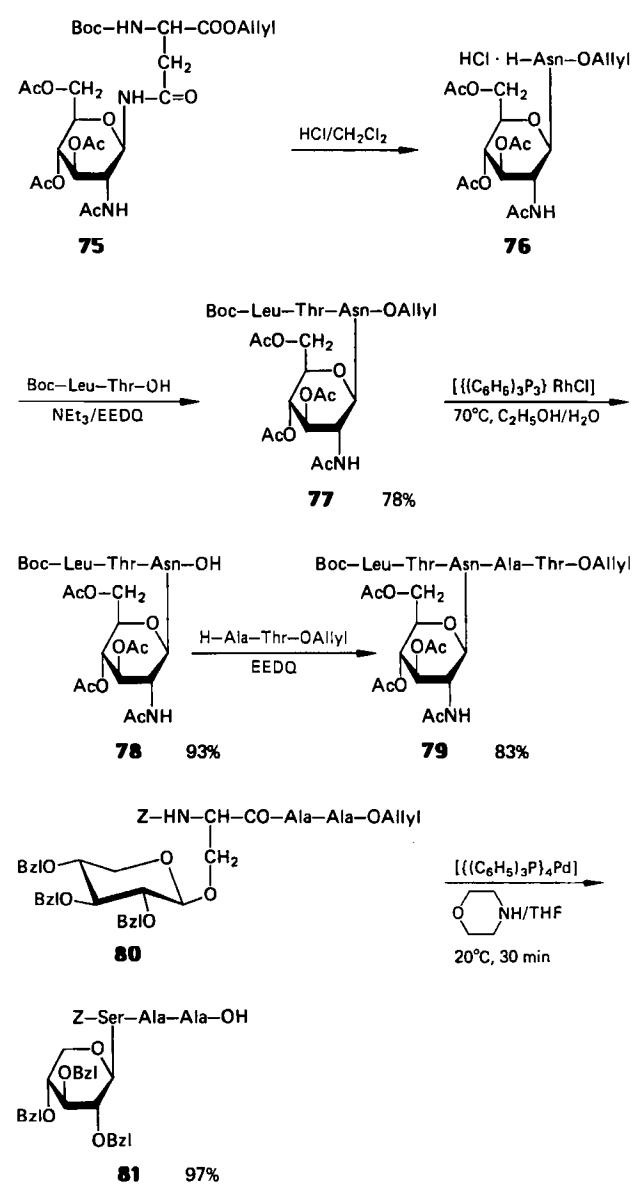
-threonin-Derivaten haben wir mit der Palladium(0)-katalysierten Allylübertragung<sup>[118]</sup> auf Morpholin als acceptierendes Nucleophil eine noch mildere Methode gefunden<sup>[61]</sup>. So kann z. B. das Xylotripeptid **80** unter diesen fast neutralen Bedingungen in Tetrahydrofuran (THF) bei



### 5.7. Allyl- und Allyloxycarbonyl(Aloc)-Schutzgruppe

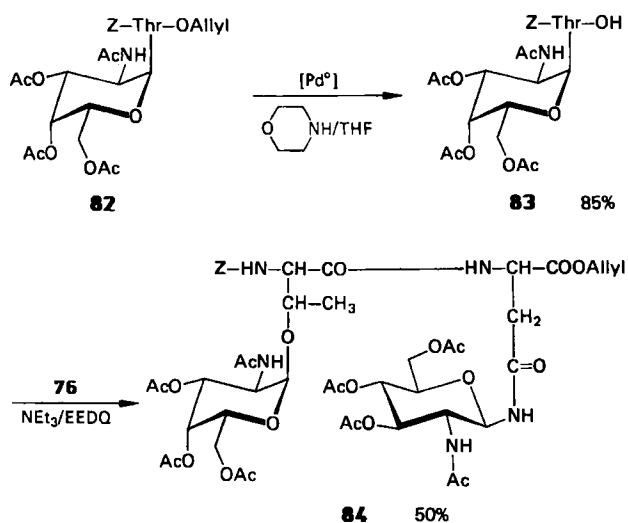
Allylester von Aminosäuren sind leicht herzustellen und unter den verschiedensten Glycosierungsbedingungen stabil<sup>[44, 61–63, 115]</sup>. In weniger empfindlichen *N*-Glycopeptiden wie **75** kann in Gegenwart der Allylgruppe selektiv die Boc-Gruppe abgespalten werden, sowohl mit Chlorwasserstoff in Dichlormethan als auch mit Trifluoressigsäure<sup>[44]</sup>. Das quantitativ gebildete, aminodeblockierte Produkt **76** kann *N*-terminal, z. B. zum Glycotripeptid **77**, verlängert werden. Zur selektiven Abspaltung der Allylgruppe aus **77**<sup>[115]</sup> wird der Allylester Rhodium(I)-katalysiert<sup>[116]</sup> zum Propenylester isomerisiert, der unter den Reaktionsbedingungen sofort hydrolysiert wird. Bei diesen neutralen Bedingungen bleiben alle anderen Bindungen erhalten. Das praktisch quantitativ und rein gebildete Produkt **78** kann jetzt *C*-terminal, z. B. zum Glycopentapeptid **79**, einer Partialstruktur aus menschlichem Orosomucoid (= saures  $\alpha_1$ -Glycoprotein)<sup>[117]</sup>, verlängert werden. Die kleine Allylgruppe hat den Vorzug, die Kondensationsreaktionen an den komplexen Molekülen weder sterisch noch durch Herabsetzung der Löslichkeit zu erschweren. Die Ausbeuten sind daher immer hoch.

Für die selektive Allylester-Spaltung bei den empfindlicheren, eliminierungsgefährdeten *O*-Glycosylserin- und

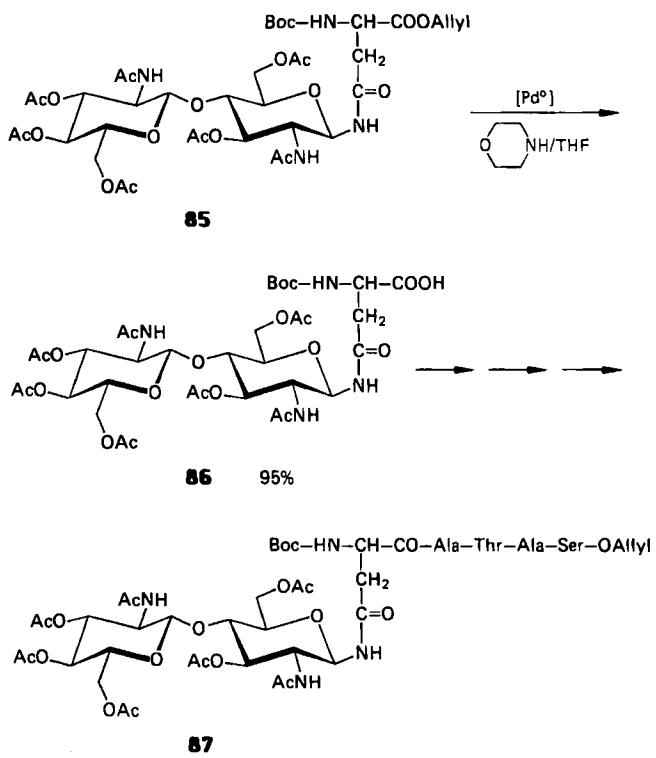


Raumtemperatur in 30 min chemospezifisch quantitativ zu **81** deblockiert werden<sup>[61]</sup>.

In der Synthese von  $\beta$ -Lactam-Antibiotica wird – was wir bei der Entwicklung unseres Verfahrens nicht wußten – eine Allylester-Spaltung als Palladium(0)-katalysierte Umesterung angewendet<sup>[119]</sup>. Schon früher wurde die Spaltung von Allylestern mit Palladiumkatalysatoren und Ammoniumformiat als Hydrogenolyse beschrieben<sup>[120]</sup>, die jedoch bei 100°C abläuft. Daher ist sie für die Glycopeptidsynthese unbrauchbar. Morpholin hat den Vorteil, daß es leicht abgetrennt werden kann und die empfindlichen Glycosidbindungen nicht angreift. Die Methode ist auch beim  $\alpha$ -Galactosaminylthreonin-allylester **82** erfolgreich, dessen Deblockierungsprodukt **83** mit dem *N*-terminal deblockierten  $N^4$ -Glucosaminylasparagin-allylester **76** zum Di-glycodipeptid **84** verknüpft wird. **84**, in dem eine  $\alpha$ -*O*- und eine  $\beta$ -*N*-Glycosylaminosäure miteinander verbunden sind, verkörpert eine besonders komplexe Partialstruktur aus dem menschlichen Glycophorin<sup>[96]</sup>.

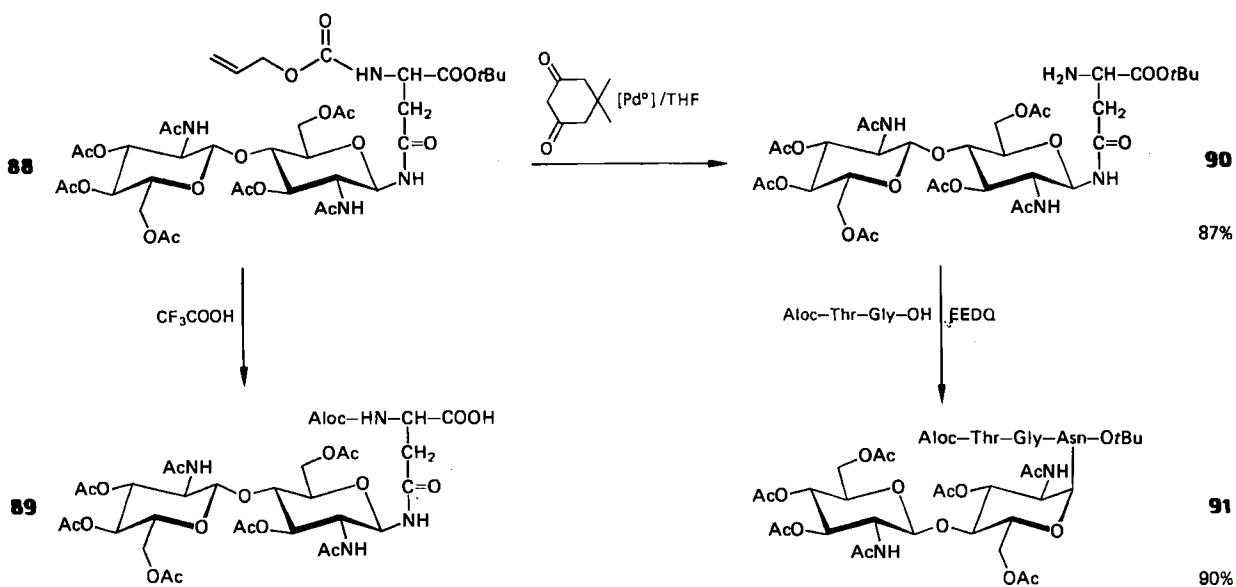


Diese außerordentlich schonende, in homogener Phase ablaufende Spaltung der stabilen Allylester gelingt ebenso bei den *N*-Glycopeptiden, z. B. bei dem Chitobiosylasparagin **85**, sehr selektiv und effektiv. Das praktisch quantitativ



gebildete, carboxydeblockierte Produkt **86** wurde durch zweimalige Kettenverlängerung mit Dipeptid-allylestern in das Chitobiosylpentapeptid **87** überführt, eine Partialstruktur aus einer Transmembran-Neuraminidase eines Influenza-Virus<sup>[44]</sup>.

Mit der Palladium(0)-katalysierten Allylübertragung auf Nucleophile wie Morpholin oder Dimedon (= 5,5-Dimethyl-1,3-cyclohexandion) lässt sich auch die Allyloxycarbonyl(Aloc)-Gruppe glatt von Peptiden und Glycopeptiden abspalten<sup>[114]</sup>. Diese schon früher beschriebene Schutzgruppe<sup>[121]</sup> galt zunächst als nicht verwendbar, weil sie sich selbst unter drastischen Bedingungen nur unvollständig abspalten ließ<sup>[122]</sup>. Ein Vorteil der Aloc-Gruppe ist ihre Beständigkeit gegenüber Trifluoressigsäure<sup>[114]</sup>, die z. B. für die praktisch quantitative *tert*-Butylester-Spaltung am Chitobiosylasparagin-Derivat **88** zu **89** wichtig ist<sup>[47]</sup>. Die Palladium(0)-katalysierte Ablösung der Aloc-Gruppe wird



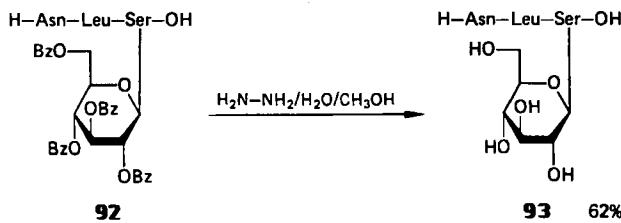
von Aminosäuren mit nucleophilen Gruppen, z. B. von Methionin, nicht beeinträchtigt<sup>[114]</sup>. Da dabei eine Aminogruppe deblockiert wird, ist die CH-Säure Dimedon als Abfangreagens besser geeignet als Morpholin. Verbindung 90 wird nach diesem Verfahren aus **88** völlig selektiv und praktisch quantitativ gebildet. Sie kann *N*-terminal verlängert werden, z. B. zum Chitobiosylriopeptid **91**<sup>[47]</sup>, einer Partialsequenz aus der Verknüpfungsregion der Neuramnidase eines anderen Influenza-Virus<sup>[123]</sup>.

Diese Synthese ist ein weiteres Beispiel dafür, daß nun immunologisch interessante Glycopeptide aufgebaut werden können. Voraussetzung für die immunologische Untersuchung synthetischer Glycopeptide ist jedoch, daß sie von den Schutzgruppen im Kohlenhydratteil befreit und an geeignete Trägermoleküle gebunden werden können.

## **6. Die Abspaltung der Schutzgruppen im Kohlenhydratteil und die Anknüpfung synthetischer Glycopeptide an Proteine**

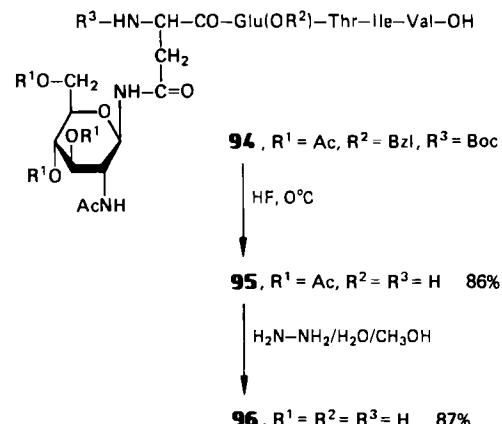
Die Abspaltung der Schutzgruppen aus den Kohlenhydratteilen ist aus zwei Gründen problematisch: 1. Es besteht die Gefahr der  $\beta$ -Eliminierung bei Glycosylserin- und -threonin-Derivaten vom Typ 2 und 3. 2. Die Aminosäurereste können racemisieren. Beide Prozesse laufen unter basischen Bedingungen ab, z. B. wenn die Estergruppen mit Ammoniak oder Triethylamin in Methanol<sup>[54,81]</sup> gespalten werden. Diese Nebenreaktionen, insbesondere Racemisierungen, wurden jüngst von *Paulsen* et al.<sup>[74]</sup> bei der Deblockierung eines Glycopeptids vom T-Antigentyp mit verschiedenen Basen, darunter Aminen, beobachtet. Sie beschrieben eine Abspaltung der Acyl-Schutzgruppen im Kohlenhydratteil ohne Nebenreaktionen mit Kaliumcyanid in Methanol/Ethanol, während mit Kaliumcyanid in Methanol 20% Racemisierung am Threonin-Rest eintritt.

An basenempfindlichen Glycosylerin-Derivaten wie 92 konnten wir zeigen, daß Acetyl- und Benzoyl-Schutzgruppen sehr sicher und racemisierungsfrei mit Hydrazin in Methanol abgespalten werden können<sup>[98]</sup>. Überschüssiges Hydrazin wird dabei durch Zugabe von Aceton entfernt.

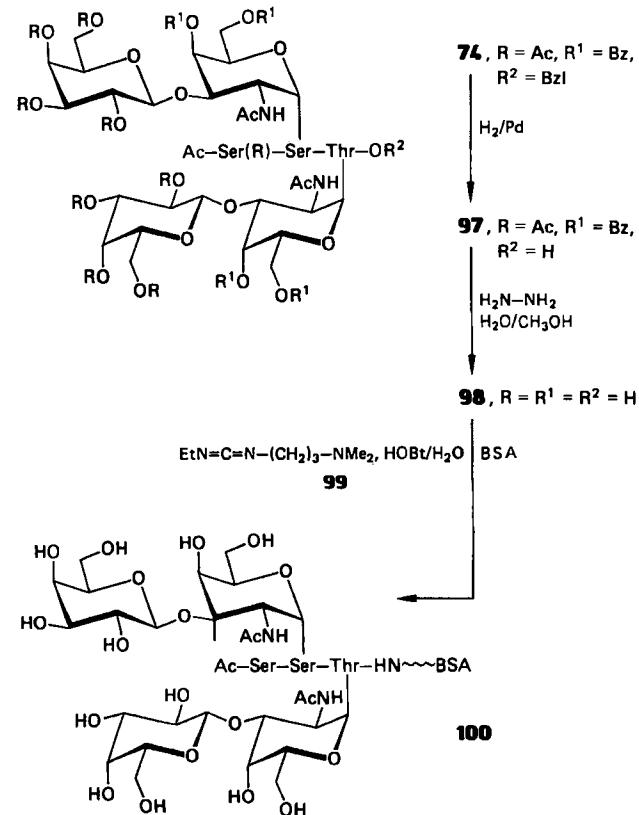


Auch N-Glycopeptide, z. B. 95, eine Partialsequenz aus dem Fibroblasten-Interferon, lassen sich nach diesem Verfahren gut deblockieren<sup>[124]</sup>. Dagegen gelang die hydrolytische Spaltung der Glutaminsäure- $\gamma$ -benzylester-Gruppe in 94 nicht, so daß die Benzyl- und die Boc-Gruppe simultan mit Fluorwasserstoff abgelöst werden mußten<sup>[124]</sup>. Dies zeigt die Grenzen der bei kleinen Einheiten wegen ihrer neutralen Bedingungen für die Glycopeptidsynthese besonders geeigneten heterogenen Hydrierung von Benzyl-Schutzgruppen an komplexeren Verbindungen auf. Die Hydrolyse von etherartig gebundenen Ben-

zylgruppen im Kohlenhydratteil der Glycopeptide wird von Pavia et al.<sup>[78, 100]</sup> erfolgreich zur Deblockierung genutzt.



Die Spaltung der vielen Estergruppen im komplexen Diglycopeptid **74** erreichten wir nach Hydrogenolyse des C-terminalen Benzylesters zu **97** wiederum schonend und quantitativ mit Hydrazin in Methanol<sup>[113]</sup>. Es entsteht das Diglycotripeptid **98**, das nach *Springer et al.*<sup>[8]</sup> die tumor-assoziierte T-Antigen-Struktur verkörpert, laut Hochfeld-<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum in reiner Form. Aufbauend auf diesen selektiven Synthesetechniken ist es uns gelungen, immunologisch relevante, klar definierte Glycopeptide wie **98** an Rinderserumalbumin (BSA) anzukoppeln<sup>[113]</sup>. Dabei wird die freie Carboxygruppe des synthetischen Glycopeptids **98** in Wasser in Gegenwart von 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt)<sup>[125]</sup> mit dem wasserlöslichen Carbodiimid **99**<sup>[126]</sup> ohne Zwischenschaltung eines Spacers, also gewissermaßen natürlich, an das Trägerprotein gebunden. Bindungsstellen im Konjugat **100** sind vermutlich vorwiegend die



$\epsilon$ -Aminogruppen der Lysinreste. Laut photometrischer Kohlenhydratanalyse werden 38 von den ca. 60 freien Aminogruppen des Proteins mit der synthetischen Glycopeptid-Antigenstruktur belegt<sup>[113]</sup>.

## 7. Ausblick

Die im vergangenen Jahrzehnt erzielten Fortschritte in der präparativen Chemie ermöglichen heute die Synthese komplexer, strukturell eindeutig definierter Glycopeptide, die typischen Ausschnitten von Glycoproteinen entsprechen. Diese wiederum sind maßgebliche Faktoren der biologischen Erkennung und Selektivität. Die Synthesen basieren einerseits auf den Entwicklungen in der Oligosaccharidsynthese<sup>[36,37]</sup> und andererseits auf den in diesem Fortschrittsbericht vorgestellten Lösungen der Probleme, die bei der gezielten Peptidsynthese an den empfindlichen Glycokonjugat-Strukturen auftraten. Die synthetischen Glycopeptide haben nicht den Nachteil der für natürliche Glycokonjugate charakteristischen mikroskopischen Heterogenität. Sie sind in präparativen Mengen herstellbar, und sie können auf komplexe biologische Trägermoleküle aufgepflastert werden. Damit sind sie in der interdisziplinären Forschung und Anwendung einsetzbar, z. B. zur Induktion von Antikörpern, zur Simulierung von Erkennungsphänomenen und zur Strukturaufklärung empfindlicher Glycoproteine. Darüber hinaus eröffnen sie eine Perspektive für die Entwicklung von gewebespezifischen Wirkstoffen und von proteolysestabilen Peptidfaktoren.

Angesichts der Vielfalt an Seitenkettenfunktionen bei Peptiden werden für den weiteren Ausbau der Glycopeptidsynthese noch zusätzliche methodische Neuerungen nötig sein, die die hier behandelten Schutzgruppentechniken ergänzen.

*Meinen Mitarbeitern, die die Entwicklung der Glycopeptidsynthese mit Engagement, Mut und Ideenreichtum vorangetrieben haben, danke ich herzlich. Es sind dies insbesondere Regina Barthels-Herweg, Stefan Birnbach, Michael Buchholz, Siglinde Friedrich-Bohnitschek, Wolfgang Günther, Albrecht Harreus, Hermann Kauth, Uwe Klinkhammer, Michael Kneip, Klaus-Jürgen Pees, Waldemar Pfrenkle, Wilfried Sager, Marita Schilling, Petra Schultheiß-Reimann, Carlo Unverzagt und Herbert Waldmann. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie danke ich für die Unterstützung, ohne die diese Arbeiten nicht möglich gewesen wären.*

Eingegangen am 28. April,  
veränderte Fassung am 15. September 1986 [A 614]

- [1] Eine moderne Zusammenfassung über Zellbiologie: B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J. D. Watson: *The Molecular Biology of the Cell*, Garland, New York 1983; *Die Molekularbiologie der Zelle*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 1986.
- [2] Zusammenfassung über Glycoproteine: J. Montricuit in A. Neuberger, L. L. M. van Deenen (Hrsg.): *Comprehensive Biochemistry*, Vol. 19BII, Elsevier, Amsterdam 1982, S. 1.
- [3] Übersicht: G. Ashwell, A. G. Morell, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 41 (1974) 99.
- [4] T. Kawasaki, G. Ashwell, *J. Biol. Chem.* 252 (1977) 6536.
- [5] a) G. N. Sando, E. F. Neufeld, *Cell* 12 (1977) 619; b) A. Kaplan, D. T. Achord, W. S. Sly, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977) 2026; c) K. von Figura, A. Hasilik, *Trends Biochem. Sci. Pers. Ed.* 9 (1984) 29.
- [6] Übersichten: a) R. T. Schwarz, R. Datema, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 40 (1982) 287; b) K. B. Olden, B. A. Bernard, M. J. Humphries, T. Yeo, K. Yeo, S. L. White, S. A. Newton, H. C. Bauer, J. B. Parent, *Trends Biochem. Sci. Pers. Ed.* 10 (1985) 78.
- [7] Eine neuere Zusammenfassung: M. Fukuda, *Biochim. Biophys. Acta* 780 (1985) 119.
- [8] Siehe z. B. G. F. Springer, P. R. Desai, M. S. Murthy, E. F. Scanlon, *ACS Symp. Ser.* 80 (1978) 311.
- [9] R. R. Race, R. Sanger: *Blood Groups in Man*, 6. Aufl., Blackwell Scientific, Oxford 1975.
- [10] Siehe z. B. J. Ofek, E. H. Beachy, N. Sharon, *Trends Biochem. Sci. Pers. Ed.* 3 (1978) 159.
- [11] G. Gregoridis, *Nature (London)* 310 (1984) 186.
- [12] Übersicht: T. Feizi, *Nature (London)* 314 (1985) 53.
- [13] Übersicht: K. Olden, J. B. Parent, S. L. White, *Biochim. Biophys. Acta* 650 (1982) 209.
- [14] a) Eine umfassende Darstellung: E. Wünsch in *Houben-Weyl-Müller: Methoden der organischen Chemie*, 4. Aufl., Band XV/1 und XV/2, Thieme, Stuttgart 1974; b) eine neuere, kürzere Übersicht: H. D. Jakubke, H. Jeschkeit: *Aminosäuren, Peptide, Proteine*, Verlag Chemie, Weinheim 1982.
- [15] P. G. Johansen, R. D. Marshall, A. Neuberger, *Biochem. J.* 78 (1961) 518.
- [16] Kurze Übersicht: a) A. J. Parodi, L. F. Leloir, *Trends Biochem. Sci. Pers. Ed.* 1 (1976) 58; b) N. Sharon, *ibid.* 9 (1984) 198.
- [17] a) R. D. Marshall, *Biochem. Soc. Symp.* 40 (1974) 17; b) E. Bause, G. Legler, *Biochem. J.* 195 (1981) 639.
- [18] F. Wieland, R. Heitzer, W. Schäfer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 5470.
- [19] G. Paul, F. Lottspeich, F. Wieland, *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 1020.
- [20] S. Shibata, H. Nakanishi, *Carbohydr. Res.* 86 (1980) 316.
- [21] T. Takeda, M. Sawaki, Y. Ogihara, S. Shibata, *Carbohydr. Res.* 139 (1985) 133.
- [22] H. Muir, *Biochem. J.* 69 (1958) 195; Übersicht: L. Roden in [34], S. 267.
- [23] T. Feizi, E. A. Kabat, G. Vicari, B. Anderson, W. L. Marsh, *J. Immunol.* 106 (1971) 1578; K. O. Lloyd, E. A. Kabat, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 61 (1968) 13470.
- [24] W. Dahr, K. Beyreuther, H. Steinbach, W. Gielen, J. Krüger, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 361 (1980) 895, zit. Lit.
- [25] D. H. van den Eijnden, N. A. Evans, J. F. Codington, V. Reinhold, C. Silber, R. W. Jeanloz, *J. Biol. Chem.* 254 (1979) 12153.
- [26] W. T. Butler, L. W. Cunningham, *J. Biol. Chem.* 241 (1966) 3882; R. G. Spiro, *ibid.* 242 (1967) 4813.
- [27] M. A. Calcott, H.-J. Müller-Eberhard, *Biochemistry* 11 (1972) 3443.
- [28] E. Fischer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 39 (1906) 530; 26 (1893) 2400.
- [29] N. Sharon, H. Lis, *Chem. Eng. News* 59 (1981) Nr. 13, S. 21.
- [30] Übersicht: H. Garg, R. W. Jeanloz, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 43 (1985) 135.
- [31] Übersicht: R. Rocchi, V. Giormani in B. Weinstein (Hrsg.): *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins*, Vol. 7, Dekker, New York 1983, S. 35.
- [32] Kurze Zusammenfassung: H. Kunz, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* 32 (1984) 11.
- [33] A. Gottschalk: *Glycoproteins: Their Composition, Structure and Function*, Elsevier, Amsterdam 1972; R. C. Hughes: *Membrane Glycoproteins*, Butterworth, London 1976.
- [34] W. J. Lennarz (Hrsg.): *The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans*, Plenum, New York 1980.
- [35] H. Schachter, *Clin. Biochem. (Ottawa)* 17 (1984) 3.
- [36] a) H. Paulsen, *Angew. Chem.* 94 (1982) 184; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 21 (1982) 155; b) *Chem. Soc. Rev.* 13 (1984) 15.
- [37] R. R. Schmidt, *Angew. Chem.* 98 (1986) 213; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 25 (1986) 212.
- [38] Siehe z. B. a) H. G. Garg, R. W. Jeanloz, *J. Org. Chem.* 41 (1976) 2480; b) M. A. E. Shaban, R. W. Jeanloz, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 54 (1981) 3570, zit. Lit.
- [39] a) G. S. Marks, R. D. Marshall, A. Neuberger, *Biochem. J.* 87 (1963) 274; b) C. H. Bolton, R. W. Jeanloz, *J. Org. Chem.* 28 (1963) 3228.
- [40] D. Horton, M. L. Wolfrom, *J. Org. Chem.* 27 (1962) 1794.
- [41] F. Micheal, H. Wulff, *Chem. Ber.* 89 (1956) 1521.
- [42] A. Yamamoto, C. Miyashita, H. Tsukamoto, *Chem. Pharm. Bull.* 13 (1965) 1041.
- [43] M. Spinola, R. W. Jeanloz, *J. Biol. Chem.* 242 (1970) 4158.
- [44] H. Kunz, H. Waldmann, *Angew. Chem.* 97 (1985) 885; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 24 (1985) 883.
- [45] C. H. Bolton, L. Hough, M. Y. Khan, *Biochem. J.* 101 (1966) 184.
- [46] H. Kunz, W. Pfrenkle, M. Kneip, unveröffentlicht; W. Pfrenkle, Diplomarbeit, Universität Mainz 1985.
- [47] H. Kunz, C. Unverzagt, unveröffentlicht.
- [48] H. G. Garg, R. W. Jeanloz, *Carbohydr. Res.* 23 (1972) 437; 43 (1975) 371.
- [49] B. Belleau, G. Malek, *J. Am. Chem. Soc.* 90 (1968) 1651.
- [50] H. Kunz, H. Waldmann, *Angew. Chem.* 95 (1983) 47; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 22 (1983) 62.
- [51] H. Kunz, H. Waldmann, unveröffentlicht.

- [52] F. Micheel, H. Köchling, *Chem. Ber.* **93** (1960) 2372.
- [53] Siehe z. B. N. K. Kochetkov, V. A. Derevitskaya, A. Y. Khorlin, M. G. Vafina, A. F. Bochkov, *Izv. Akad. Nauk SSSR Ser. Khim.* 1965, 1698.
- [54] B. Lindberg, B. G. Silvander, *Acta Chem. Scand.* **19** (1965) 530.
- [55] P. G. Garegg, B. Lindberg, T. Norberg, *Acta Chem. Scand. Ser. B* **33** (1979) 449.
- [56] H.-J. Koeners, C. Schattenkerk, J. Verhoven, J. H. van Boom, *Tetrahedron* **37** (1981) 1763.
- [57] H. Kunz, M. Buchholz, *Chem. Ber.* **112** (1979) 2145.
- [58] S. Hanessian, J. Banoub, *Carbohydr. Res.* **53** (1977) C 13.
- [59] H. Kunz, M. Buchholz, *Angew. Chem.* **93** (1981) 917; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **20** (1981) 894.
- [60] R. R. Schmidt, J. Michel, *Angew. Chem.* **92** (1980) 763; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **19** (1980) 731.
- [61] H. Kunz, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **96** (1984) 49; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **23** (1984) 71.
- [62] H. Kunz, W. Sager, *Helv. Chim. Acta* **68** (1985) 283.
- [63] H. Kunz, W. Pfrengle, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1986, 713.
- [64] H. Kunz, A. Harreus, *Liebigs Ann. Chem.* 1982, 41.
- [65] T. Ogawa, K. Beppu, S. Nakabayashi, *Carbohydr. Res.* **93** (1981) C 6.
- [66] H. Kunz, U. Klinkhammer, unveröffentlicht.
- [67] H. G. Garg, R. W. Jeanloz, *Carbohydr. Res.* **52** (1976) 246.
- [68] H. Paulsen, C. Kolar, W. Stenzel, *Chem. Ber.* **111** (1978) 2370.
- [69] a) B. Ferrari, A. A. Pavia, *Carbohydr. Res.* **79** (1980) C 1; b) *Bioorg. Chem.* **11** (1982) 85.
- [70] R. U. Lemieux, M. M. Ratcliff, *Can. J. Chem.* **57** (1979) 1224.
- [71] H. Paulsen, J.-P. Höck, *Carbohydr. Res.* **109** (1982) 89.
- [72] a) H. Paulsen, M. Paal, M. Schultz, *Tetrahedron Lett.* **24** (1983) 1759; b) H. Paulsen, M. Paal, *Carbohydr. Res.* **135** (1984) 53; c) K. Heyns, D. Feldmann, D. Hadamczyk, J. Schwentner, J. Thiem, *Chem. Ber.* **114** (1981) 232.
- [73] T. Adachi, Y. Yamada, J. Inone, *Synthesis* 1977, 45.
- [74] H. Paulsen, M. Schultz, J.-D. Klamann, B. Waller, M. Paal, *Liebigs Ann. Chem.* 1985, 2028.
- [75] S. Friedrich-Bohnitschek, *Dissertation*, Universität Mainz 1986; S. Birnbach, *Dissertation*, Universität Mainz 1985; H. Kunz, *Proc. München Shanghai Symp. Pept. Protein Chem.* 1986, 45.
- [76] G. Gründler, R. R. Schmidt, *Liebigs Ann. Chem.* 1984, 1826.
- [77] J. M. Lacombe, A. A. Pavia, J. M. Rocheville, *Can. J. Chem.* **59** (1981) 573.
- [78] A. A. Pavia, B. Ferrari, *Int. J. Pept. Protein Res.* **22** (1983) 549, 539.
- [79] \*M. Buchholz, *Dissertation*, Universität Mainz 1982.
- [80] S. Lavielle, N. C. Ling, R. Saltman, R. C. Guillemin, *Carbohydr. Res.* **89** (1981) 229.
- [81] V. Verez Bencomo, P. Sinaÿ, *Carbohydr. Res.* **116** (1983) C 9.
- [82] H. Waldmann, *Dissertation*, Universität Mainz 1985.
- [83] R. Kuhn, I. Löw, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **B74** (1941) 219.
- [84] Übersicht: R. D. Marshall, A. Neuberger, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **25** (1970) 407.
- [85] a) J. R. Vercellotti, R. Fernandez, C. J. Chang, *Carbohydr. Res.* **5** (1967) 97; b) K. Wakabayashi, W. Pigman, *ibid.* **35** (1974) 3.
- [86] H. Kunz, K.-J. Pees, unveröffentlicht.
- [87] Siehe S. 206–208 in der englischen bzw. 225–227 in der deutschen Version von [1].
- [88] H. Kunz, *Chem. Ber.* **109** (1976) 2670.
- [89] a) H. Kunz, H. Kauth, *Angew. Chem.* **93** (1981) 918; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **20** (1981) 895; b) *Liebigs Ann. Chem.* 1983, 337.
- [90] a) H.-H. Bechtolsheimer, H. Kunz, *Angew. Chem.* **94** (1982) 637; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **21** (1982) 630; b) *Liebigs Ann. Chem.* 1982, 2068.
- [91] H. Kauth, H. Kunz, *Liebigs Ann. Chem.* 1983, 360.
- [92] H. Eckert, J. Lagerlund, J. Ugi, *Tetrahedron* **33** (1977) 2243.
- [93] H. Kunz, *Justus Liebigs Ann. Chem.* 1976, 1674.
- [94] M. Buchholz, H. Kunz, *Liebigs Ann. Chem.* 1983, 1859.
- [95] L. Horner, H. Neumann, *Chem. Ber.* **98** (1965) 3462.
- [96] H. Kunz, S. Friedrich-Bohnitschek, unveröffentlicht; S. Friedrich-Bohnitschek, *Diplomarbeit*, Universität Mainz 1982.
- [97] L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Am. Chem. Soc.* **92** (1970) 5748.
- [98] P. Schultheiß-Reimann, H. Kunz, *Angew. Chem.* **95** (1983) 64; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **22** (1983) 62; *Angew. Chem. Suppl.* **1983**, 39.
- [99] J. M. Lacombe, A. A. Pavia, *J. Org. Chem.* **48** (1983) 2557.
- [100] B. Ferrari, A. A. Pavia, *Tetrahedron* **41** (1985) 1939, zit. Lit.
- [101] J. P. Carton in C. Salomon (Hrsg.): *Blood Groups and Other Red Cell Surface Markers in Health and Disease*, Masson, New York 1982, S. 39 ff.
- [102] J. Martinez, J. C. Tolle, M. Bodanszky, *J. Org. Chem.* **44** (1979) 3596.
- [103] H. Kunz, P. Schultheiß-Reimann, unveröffentlicht; P. Schultheiß-Reimann, *Dissertation*, Universität Mainz 1984.
- [104] V. Verez Bencomo, P. Sinaÿ, *Glycoconjugate J.* **1** (1984) 1.
- [105] S. Birnbach, *Dissertation*, Universität Mainz 1985.
- [106] K. Inouye, Y. Sumitomo, M. Shin, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **49** (1976) 3620.
- [107] E. Wünsch, E. Jaeger, L. Kisfaludy, M. Löw, *Angew. Chem.* **89** (1977) 330; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **16** (1977) 317; B. F. Lundt, N. L. Johansen, A. Volund, G. Markussen, *Int. J. Pept. Protein Res.* **12** (1978) 258.
- [108] S. Lavielle, N. C. Ling, R. C. Guillemin, *Carbohydr. Res.* **89** (1981) 221.
- [109] P. Mamalis, H. N. Rydon, *J. Chem. Soc.* **1955**, 1049; R. Barthels, H. Kunz, *Angew. Chem.* **94** (1982) 302; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **21** (1982) 292; *Angew. Chem. Suppl.* **1982**, 702; *Chem. Ber.* **115** (1982) 833, zit. Lit.
- [110] H. Kunz, R. Barthels, *Angew. Chem.* **95** (1983) 799; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **22** (1983) 783.
- [111] H. Kunz, S. Birnbach, *Tetrahedron Lett.* **25** (1984) 3567.
- [112] H. Kunz, A. Harreus, unveröffentlicht; A. Harreus, *Dissertation*, Universität Mainz 1983.
- [113] H. Kunz, S. Birnbach, *Angew. Chem.* **98** (1986) 354; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **25** (1986) 360.
- [114] H. Kunz, C. Unverzagt, *Angew. Chem.* **96** (1984) 426; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **23** (1984) 436.
- [115] H. Waldmann, H. Kunz, *Liebigs Ann. Chem.* 1983, 1712.
- [116] E. J. Corey, J. W. Suggs, *J. Org. Chem.* **38** (1973) 3234.
- [117] L. Mester in K. Laki (Hrsg.): *Fibrinogen*, Dekker, New York 1980, S. 165.
- [118] Für C-Allylierungen siehe Übersicht: B. M. Trost, *Acc. Chem. Res.* **13** (1980) 1.
- [119] P. D. Jeffrey, S. W. McCombie, *J. Org. Chem.* **47** (1982) 587.
- [120] J. Tsuji, T. Yamakawa, *Tetrahedron Lett.* **1979**, 613.
- [121] C. M. Stevens, R. Watanabe, *J. Am. Chem. Soc.* **72** (1950) 725.
- [122] Siehe [14a], Band 1, S. 96.
- [123] S. Fields, G. Winter, *Nature (London)* **290** (1981) 213.
- [124] H. Kunz, H. Waldmann, *Helv. Chim. Acta* **68** (1985) 618.
- [125] W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* **106** (1973) 3626.
- [126] J. C. Sheehan, P. A. Cruickshank, G. L. Boshart, *J. Org. Chem.* **26** (1961) 2525.